

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

PATRÍCIA YUKIKO MONTAÑO

**OCORRÊNCIA DE COINFECÇÕES EM GATOS DOMÉSTICOS
ANÊMICOS E NÃO ANÊMICOS**

CURITIBA

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

PATRÍCIA YUKIKO MONTAÑO

**OCORRÊNCIA DE COINFECÇÕES EM GATOS DOMÉSTICOS
ANÊMICOS E NÃO ANÊMICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Patologia Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Professora Dra. Rosângela Locatelli Dittrich

Coorientador: Professor Dr. Alexander Welker Biondo

Comitê de Orientação: Professora Dra. Simone Tostes de Oliveira Stedile e Professor Dr. Fabiano Montiani Ferreira

CURITIBA

2014

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada **“OCORRÊNCIA DE COINFECÇÕES EM GATOS DOMÉSTICOS ANÊMICOS E NÃO ANÊMICOS”** apresentada pela Mestranda **PATRÍCIA YUKIKO MONTAÑO** declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou a candidata APTA para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 24 de fevereiro de 2014

Professora Dra. Rosângela Locatelli Dittrich
Presidente/Orientadora

Professora Dra. Simone Tostes de Oliveira Stédile
Membro

Professora Dra. Angela Patrícia Medeiros Veiga
Membro

Dedico este trabalho aos meus familiares e amigos
que me deram apoio e incentivo nesta jornada.

Aos apaixonados pela Medicina Felina.

Aos gatos domésticos, seres incríveis sempre
presentes de um modo tão especial na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pelo constante apoio e incentivo na minha carreira. Obrigada pai, por ser um exemplo de profissional e pesquisador na minha vida, que com certeza me inspira a lutar para ser cada vez melhor. Obrigada mãe, pelo carinho, preocupação e cuidados, e por me acolher quando mais precisei.

Ao meu noivo Gabriel, por acreditar e confiar que podemos buscar dias melhores, sempre. Por me incentivar e apoiar nas horas de desânimo, de preguiça, de correria e de extremo cansaço. Ainda colheremos belos frutos deste nosso investimento.

Às minhas gatas Judy e Angie, que estiveram presentes comigo dos momentos mais difíceis aos mais felizes, mostrando dia a dia o porquê amo tanto os gatos.

Aos colegas residentes do Laboratório de Patologia Clínica da UFPR, Rafael H. Hagi, Fabiana Tieme e Carlos Czp Ktz, pelos ensinamentos, apoio, conversas jogadas fora e por aguentarem minhas “Patices”. Desculpem pelas lâminas, tubos e trinco quebrados, tropeços e esbarrões. Apesar do prejuízo com o meu desajeito, demos boas risadas e criamos uma bela amizade.

Ao Olair C. Beltrame, por me ajudar tanto com os exames bioquímicos, sempre com tanta disposição. À Gabriela Maffezzolli, aluna de iniciação científica, que se aventurou comigo nas coletas das amostras e sempre foi muito dedicada e prestativa na execução do trabalho. À Karina Kagy, minha amiga gateira, que sempre me ajuda e apoia quando preciso.

Às minhas amigas mestrandas Aline B. R. Gizzi e Thais Knopf, pelo companheirismo, carinho e ajuda em todos os momentos. Em especial à Aline, por ter me ajudado de corpo e alma na execução do projeto e na escrita dos artigos. Aline, você foi uma das pessoas mais importantes nesta minha jornada e agradeço de coração por tudo que fez por mim.

Ao Rafael Stedile e ao meu cunhado Todd Robeck, pela disponibilidade em ajudar nas análises estatísticas. Ao professor Alexander W. Biondo, pela idéia do projeto e pelo eterno incentivo na minha carreira. Ao Christian Leutenegger, por permitir que esse trabalho fosse executado de uma forma tão completa com as análises feitas no laboratório IDEXX, Inc.

À professora e orientadora Rosângela L. Dittrich, por acreditar tanto na minha capacidade e confiar no meu trabalho. Aos professores Simone T. O. Stedile e Fabiano M. Ferreira, por terem me auxiliado e guiado durante a qualificação e em outros momentos que precisei.

MUITO OBRIGADA !!!

“O segredo é não correr atrás das borboletas... É cuidar do jardim para que elas venham até você.”

Mario Quintana

RESUMO

A anemia por doença infecciosa em gatos é causada principalmente por retrovírus, hemoparasitas, ou por sua associação. No Brasil, os hemoparasitas de gatos domésticos são pouco relatados e coinfeções foram descritas apenas em alguns estados, devido à baixa sensibilidade e especificidade da hematoscopia e ao alto custo na utilização da biologia molecular para o diagnóstico individual de cada agente. As infecções pelos retrovírus FIV (vírus da imunodeficiência felina) e FeLV (vírus da leucemia felina) são responsáveis por alta morbidade e mortalidade em gatos domésticos no mundo todo. Os hemoparasitas comumente são agentes oportunistas em uma infecção retroviral, devido à imunodeficiência causada pelo vírus, podendo agravar o quadro clínico do paciente. Os principais fatores de risco para infecção por retrovírus já foram estabelecidos, no entanto, o papel de artrópodes sugadores de sangue e o contato entre gatos na disseminação desses agentes são desconhecidos. Os fatores de risco relacionados à infecção pelos hemoparasitas não estão completamente elucidados. Os objetivos deste estudo foram: determinar a prevalência de infecções e coinfeções entre retrovírus e hemoparasitas em gatos domésticos anêmicos e não anêmicos; avaliar a correlação entre grau de regeneração da anemia e a presença de coinfeções; a taxa de óbito em relação aos gatos coinfectados; avaliar a ocorrência de outras doenças que não envolvam anemia na presença de infecções e coinfeções; e estabelecer os fatores de risco envolvidos em infecções e coinfeções por hemoparasitas e retrovírus a fim de estabelecer medidas de prevenção. Foram avaliadas 142 amostras de sangue de gatos domésticos, sendo 40 doentes anêmicos (grupo I), 50 doentes não anêmicos (grupo II) e 52 saudáveis (grupo III). Realizou-se um painel de detecção de patógenos pela técnica do PCR em tempo real para os seguintes agentes: *Anaplasma spp.*, *Bartonella spp.*, *Cytauxzoon felis*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma haemofelis*, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', '*Candidatus Mycoplasma turicensis*', FIV e FeLV; e sorologia para detecção de anticorpos contra FIV e antígeno (proteína nuclear p27) da FeLV. Do total de amostras, 29% (59/142) foram positivas para pelo menos um agente etiológico, sendo que destas, 38/59 (64,4%) apresentaram infecção única e 35,6% (21/59) coinfeção. Gatos machos, na faixa etária entre um e oito anos, e com acesso à rua são mais predispostos a infecções por hemoparasitas e pelos retrovírus FIV e FeLV.

Palavras-chave: anemia, gatos, hemoparasitas, retrovírus, coinfeções

ABSTRACT

Anemia due to infectious disease in cats is mainly caused by retroviruses, hemoparasites, or by their association. In Brazil, hemoparasites of domestic cats are rarely reported and coinfections were described only in some states, due to low sensitivity and specificity of hematology and high costs in the use of molecular biology to the diagnosis of each individual agent. Infections by retroviruses FIV (feline immunodeficiency virus) and FeLV (feline leukemia virus) are responsible for high morbidity and mortality in domestic cats worldwide. Hemoparasites commonly are opportunistic agents in a retroviral infection due to immunodeficiency caused by virus, and may worsen the patient's condition. The main risk factors for infection by retroviruses have been established, however, the role of blood-sucking arthropods and contact between cats in the spread of these agents is unknown. Risk factors related to infection by hemoparasites are not fully elucidated. The objectives of this study were to determine the prevalence of infections and coinfections between retroviruses and hemoparasites in anemic and non-anemic domestic cats; evaluate the correlation between the degree the anemia regeneration and the presence of coinfections; the rate of death compared to coinfecting cats; review the occurrence of other diseases not involving anemia in the presence of infections and coinfections; and establish the risk factors involved in infections and coinfections by retroviruses hemoparasites to establish preventive measures. One hundred and forty two blood samples from domestic cats, 40 anemic patients (group I), 50 non-anemic patients (group II) and 52 healthy cats (group III) were evaluated. A real time PCR panel was performed for the following agents: *Anaplasma spp*, *Bartonella spp*, *Cytauxzoon felis*, *Ehrlichia spp*, *Mycoplasma haemofelis*, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', '*Candidatus Mycoplasma turicensis*', FIV and FeLV, and serology for detection of FIV antibodies and antigen (p27 core protein) of FeLV. Of the total sample, 29% (59/142) were positive for at least one agent, and of these, 38/59 (64.4%) had single infection and 35.6% (21/59) coinfection. Male cats aged between one and eight years, with access to the street are more susceptible to hemoparasites and FIV and FeLV infections.

Key words: anemia, cats, hemoparasites, retrovirus, coinfections

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 2 AGENTES INFECCIOSOS E COINFECÇÕES EM GATOS ANÊMICOS E NÃO ANÊMICOS:

QUADRO 1. Algoritmo da classificação dos gatos em grupos de acordo com os sinais clínicos e exames laboratoriais.....10

CAPÍTULO 3 FATORES DE RISCO PARA INFECÇÕES E COINFECÇÕES POR HEMOPARASITAS E RETROVÍRUS EM GATOS DOMÉSTICOS:

QUADRO 1. Questionário de avaliação dos fatores de risco em infecções e coinfeções pelos hemoparasitas: *Anaplasma spp.*, *Bartonella spp.*, *Cytauxzoon felis*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma haemofelis*, ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’, ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’, e retrovírus FIV e FeLV em gatos domésticos de Curitiba/PR, Brasil.....28

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 AGENTES INFECCIOSOS E COINFECÇÕES EM GATOS ANÊMICOS E NÃO ANÊMICOS:

TABELA 1. Prevalência de infecções e coinfeções e pelos hemoparasitas: *Anaplasma spp.*, *Bartonella spp.*, *Cytauxzoon felis*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma haemofelis*, ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’, ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’; e retrovírus FIV e FeLV em gatos domésticos (Curitiba/PR, Brasil).....12

TABELA 2. Associação entre os hemoparasitas *Anaplasma spp.*, *Bartonella spp.*, *Cytauxzoon felis*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma haemofelis*, ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’, ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’; e os retrovírus FIV e FeLV em gatos domésticos (Curitiba/PR, Brasil).....13

TABELA 3. Prevalência de infecções por hemoparasitas e retrovírus em gatos domésticos (Curitiba/PR, Brasil).....14

TABELA 4. Prevalência de infecções por hemoparasitas e retrovírus em gatos domésticos no Brasil.....15

TABELA 5. Prevalência de doenças *Anaplasma spp.*, *Bartonella spp.*, *Cytauxzoon felis*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma haemofelis*, ‘*Candidatus M. haemominutum*’, ‘*Candidatus M. turicensis*’, e retrovírus FIV e FeLV em gatos anêmicos e não anêmicos (Curitiba/PR, Brasil)..16

CAPÍTULO 3 FATORES DE RISCO PARA INFECÇÕES E COINFECÇÕES POR HEMOPARASITAS E RETROVÍRUS EM GATOS DOMÉSTICOS:

TABELA 1. Prevalência de infecções e coinfeções dos hemoparasitas: *Bartonella spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma haemofelis*, ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’, ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’; e dos retrovírus FIV e FeLV em gatos domésticos (n=142) de Curitiba/PR, Brasil.....30

TABELA 2. Prevalência de infecções por hemoparasitas e retrovírus em gatos domésticos de Curitiba/PR, Brasil.....30

TABELA 3. Prevalência de fatores de risco em infecções por hemoparasitas e retrovírus em gatos domésticos de Curitiba/PR, Brasil.....33

TABELA 4. Prevalência de fatores de risco em infecções únicas e coinfeções entre os hemoparasitas: *Bartonella spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma haemofelis*, ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’, ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’; e retrovírus FIV e FeLV em gatos domésticos (n=142) de Curitiba/PR, Brasil.....34

TABELA 5. Relação entre sexo e a presença de infecções por hemoparasitas e retrovírus em gatos domésticos de Curitiba/PR, Brasil.....35

TABELA 6. Relação entre sexo e a presença de infecções e coinfeções pelos hemoparasitas: *Bartonella spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma haemofelis*, ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’, ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’; e retrovírus FIV e FeLV em gatos domésticos de Curitiba/PR, Brasil.....35

TABELA 7. Relação entre idade e a presença de infecções por hemoparasitas e retrovírus em gatos domésticos de Curitiba/PR, Brasil.....36

TABELA 8. Relação entre faixa etária e a presença de infecções e coinfeções pelos hemoparasitas: *Bartonella spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma haemofelis*, ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’, ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’; e retrovírus FIV e FeLV em gatos domésticos de Curitiba/PR, Brasil.....36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>C. felis</i>	<i>Ctenocephalides felis</i>
CA	Califórnia
<i>E. canis</i>	<i>Ehrlichia canis</i>
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	enzyme-linked immunoabsorbent assay
EUA	Estados Unidos da América
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
DNA	ácido desoxirribonucleico
FeLV	leucemia viral felina
FIV	vírus da imunodeficiência felina
IN	Indiana
Inc.	incorporation
<i>M.</i>	<i>Mycoplasma</i>
MA	Maranhão
MDA	maternally derived antibody
ME	Maine
MG	Minas Gerais
MGG	May-Grunwald-Giemsa
ml	mililitro
MT	Mato Grosso
n	nº de amostras
PA	Pará
PCR	reação em cadeia da polimerase
PE	Pernambuco
PIF	peritonite infecciosa felina
qPCR	reação em cadeia da polimerase em tempo real
PR	Paraná
RJ	Rio de Janeiro
rpm	rotações por minuto
rRNA	ácido ribonucleico ribossomal
RS	Rio Grande do Sul
SP	São Paulo
<i>Sp.</i>	espécie
<i>spp.</i>	espécies
VG	volume globular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1 HIPÓTESE.....	3
1.2 OBJETIVO GERAL.....	3
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
REFERÊNCIAS.....	4
 2 AGENTES INFECCIOSOS E COINFECÇÕES EM GATOS ANÊMICOS E NÃO ANÊMICOS.....	6
2.1 RESUMO.....	6
2.2 ABSTRACT.....	7
2.3 INTRODUÇÃO.....	8
2.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	9
2.4.1 Animais.....	9
2.4.2 Amostras.....	10
2.4.3 PCR em tempo real e ELISA.....	11
2.4.4 Análise estatística.....	11
2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
2.5.1 Prevalência de infecções e coinfeções.....	12
2.5.2 Grau de regeneração da anemia e taxa de óbito.....	16
2.5.3 Relação entre doenças e infecções por hemoparasitas e retrovírus.....	16
2.5.4 Hematoscopia.....	17
2.5.5 Comparação das técnicas realizadas no diagnóstico de retrovirose.....	17
2.6 CONCLUSÃO.....	18
REFERÊNCIAS.....	19
 3 FATORES DE RISCO PARA INFECÇÕES E COINFECÇÕES POR HEMOPARASITAS E RETROVÍRUS EM GATOS DOMÉSTICOS.....	24
3.1 RESUMO.....	24
3.2 ABSTRACT.....	25
3.3 INTRODUÇÃO.....	26
3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.4.1 Animais.....	27
3.4.2 Amostras.....	28
3.4.3 Questionário.....	28
3.4.4 PCR em tempo real e ELISA.....	29
3.4.5 Análise estatística.....	29
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
3.5.1 Prevalência de infecções e coinfeções.....	30
3.5.2 Prevalência de fatores de risco para hemoparasitas e retrovírus.....	31
3.5.3 Presença de infecções e coinfeções em relação ao sexo.....	34
3.5.4. Presença de infecções e coinfeções em relação à faixa etária.....	35
3.6 CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS.....	37
 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
 5 APÊNDICES.....	43
5.1 FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA E QUESTIONÁRIO.....	43

6 ANEXOS	44
6.1 CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA SCA.....	44
6.2 RESUMO APRESENTADO NO 34º CONGRESSO DA ANCLIVEPA.....	45

1. INTRODUÇÃO GERAL

A anemia por doença infecciosa em gatos é causada principalmente por retrovírus, hemoparasitas, ou por sua associação. O diagnóstico destes agentes é um desafio na rotina clínica veterinária, devido à baixa sensibilidade e especificidade da hematoscopia e ao alto custo na utilização da biologia molecular para o diagnóstico individual de cada agente (Correa et al., 2011).

As infecções pelos retrovírus FIV (vírus da Imunodeficiência Felina) e FeLV (vírus da Leucemia Felina) são responsáveis pelas doenças infecciosas mais prevalentes em gatos domésticos no mundo todo (Hartmann et al., 2001). Segundo Souza & Teixeira (2003) a anemia em gatos infectados pela FeLV pode ser atribuída às doenças inflamatórias ou desordem primária da medula óssea. No caso de doença inflamatória, parece ocorrer uma retenção das reservas de ferro no sistema monocítico fagocitário, hepatócitos e células epiteliais intestinais, havendo uma insuficiência de ferro para a hematopoese. Na FIV, a anemia é mais comum e mais grave em gatos com imunossupressão clinicamente avançada, provavelmente por infecção em células precursoras na medula óssea (Harbour et al., 2006).

Os hemoparasitas comumente são agentes oportunistas em uma infecção retroviral, devido à imunodeficiência causada pelo vírus, podendo agravar o quadro clínico do paciente (Harrus et al, 2002; Luria et al., 2004; Harvey, 2006). Os hemoparasitas mais relatados nestes casos são os hemoplasmas, que são o *Mycoplasma haemofelis*, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' e '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' (Sykes et al., 2007). No entanto, outros hemoparasitas como *Ehrlichia spp.*, *Anaplasma spp.*, *Bartonella spp.* e *Cytauxzoon spp.* podem estar envolvidos e devem ser pesquisados (Oliveira, 2008; Correa et al., 2011; Braga et al., 2013; Maia et al., 2013; Miceli et al., 2013).

Os hemoparasitas podem ser agentes primários, ou ainda estarem associados com outros hemoparasitas, na causa da anemia. No caso dos hemoplasmas, é importante identificar a espécie devido à variação na patogenicidade, sendo que o *M. haemofelis* é reconhecidamente o mais patogênico podendo, sozinho, causar anemia aguda (Grace & Norsworthy, 2011). As infecções agudas por *M. haemofelis* podem gerar crises hemolíticas acentuadas e às vezes fatais, inclusive em animais imunocompetentes, sendo a mortalidade elevada nesta fase (Sykes, 2003). O '*Candidatus M. haemominutum*' parece ser patogênico apenas em coinfeções com retrovírus e pode ser um cofator na progressão de doenças retrovirais, neoplasias e doenças imunomediadas. O '*Candidatus M. turicensis*' é uma

descoberta recente e o seu significado permanece incerto, mas sugere-se que seu potencial patogênico dependa de cofatores (Willi et al., 2006b; Grace & Norsworthy, 2011).

Estudos sugerem diferenças entre os três hemoplasmas também nas suas habilidades de estabelecer uma condição portadora. Um estado de portador parece ser comumente encontrado em infecções por '*Candidatus M. haemominutum*', mas menos frequente em infecções por *M. haemofelis* (Tasker, 2006). Por outro lado, eliminação espontânea da bacteremia de '*Candidatus M. turicensis*' foi relatada em dois gatos infectados experimentalmente, permanecendo sem infecção mesmo após 1 ano e após imunodepressão (Willi et al., 2006a). Estes portadores clinicamente sadios podem se tornar carreadores crônicos por um longo tempo, mesmo quando tratados com antibióticos efetivos contra o agente, podendo ocorrer reativação da doença em uma imunossupressão (Willi et al., 2006b).

Ehrlichia e *Anaplasma* são parasitas intra-celulares obrigatórios de plaquetas e leucócitos. Existem poucos relatos sobre estas bactérias em gatos no Brasil (Almosny & Massard, 2002; Correa et al., 2011). Até o momento, pouco se sabe sobre a patogênese da Anaplasmoze em gatos, sendo que muitos apresentam sinais vagos, não específicos da doença (Grace, 2011). A natureza inespecífica dos sinais clínicos pode ter resultado no subdiagnóstico deste parasita no Brasil (Oliveira, 2008).

A cytauxzoonose é causada por um protozoário e os felídeos quando infectados podem apresentar obstrução vascular ou anemia hemolítica com alta taxa de mortalidade (Robson & Crystal, 2011). Entretanto, foram encontrados felídeos clinicamente saudáveis sendo portadores do agente, sugerindo a existência do estado de portador assintomático do *Cytauxzoon felis* (Brown et al., 2008). Recentes estudos sugerem que existam diferentes genótipos deste parasito, podendo alguns serem mais patogênicos do que outros (Robson & Crystal, 2011).

Os gatos são reservatórios para diversas espécies de *Bartonella* que são associadas como zoonose, como a *Bartonella henselae*, *Bartonella clarridgeae* e a *Bartonella koehlerae*, causando principalmente a doença da arranhadura do gato nos seres humanos (Robson & Crystal, 2011). O papel desta bactéria como causadora de doença em gatos ainda é incerta, porém verificou-se que coinfeção com o vírus da imunodeficiência felina (FIV) é mais provável de causar gengivite e linfadenopatia, do que qualquer um desses agentes sozinho (Robson & Crystal, 2011). A anemia está bem descrita em infecções experimentais por *Bartonella spp.* (Souza, 2009).

1.1 HIPÓTESE

A hipótese deste trabalho é de que haja uma alta prevalência de hemoparasitas e coinfeções em gatos anêmicos, e que as mesmas podem estar diretamente correlacionadas com a severidade da doença.

1.2 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência de infecções e coinfeções entre retrovírus e hemoparasitas, bem como os fatores de risco associados, em gatos domésticos anêmicos e não anêmicos.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Estabelecer a prevalência individualizada de cada agente infeccioso em gatos domésticos anêmicos, doentes não anêmicos e saudáveis;
- 2- Determinar a prevalência de coinfeções nestes mesmos grupos;
- 3- Avaliar se há correlação entre coinfeção e grau de regeneração de anemia e a taxa de óbitos;
- 4- Avaliar a ocorrência de outras doenças que não envolvam anemia na presença de infecções e coinfeções;
- 5- Investigar os fatores de risco associados às infecções por hemoparasitas e retrovírus em gatos domésticos.

REFERÊNCIAS

- Almosny, N.R.P., Massard, C.L., Erliquiose em pequenos animais domésticos e como zoonose. In: Almosny, N.R.P. **Hemoparasitoses em Pequenos Animais Domésticos e como Zoonoses**. L.F. Livros, 2002, p.14-56.
- Braga, I.A., Santos, L.G.F., Melo, A.L.T., Jaune, F.W., Ziliani, T.F., Girardi, A.F., Aguiar, D.M. Hematological values associated to the serological and molecular suspected of *Ehrlichia canis* infection. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.22, n.4, p.470-474, 2013.
- Correa, E.S., Paludo, G.R., Scaloni, M.C., Machado, J.A., Lima, A.C.Q., Pinto, A.T.B., Thiebaut, J.T.L., Albernaz, A.P. Investigação molecular de *Ehrlichia spp.* e *Anaplasma platys* em felinos domésticos: alterações clínicas, hematológicas, bioquímicas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.10, p.899-909, 2011.
- Grace, S.F. Anaplasmosis. In: Norsworthy, G.D., Grace, S.F., Crystal, M.A., Tilley, L.P. **The Feline Patient**. 4. ed. Wiley-Blackwell, 2011. Cap. 8, p.18.
- Grace, S.F., Norsworthy, G.D. Hemoplasmosis. In: Norsworthy, G.D., Grace, S.F., Crystal, M.A., Tilley, L.P. **The Feline Patient**. 4.ed. Wiley-Blackwell, 2011. Cap. 92, p.218-219.
- Hartmann, K., Werner, R.M., Egberink, H., Jarrett, O. Comparison of six in-house tests for the rapid diagnosis of feline immunodeficiency and feline leukaemia virus infections. **The Veterinary Record**, v.149, n.11, p.317-320, 2001.
- Harbour, D.A., Caney, S.M.A., Sparkes, A.H. Infecção pelo vírus da Imunodeficiência Felina. In: **Clínica e Terapêutica em Felinos**. 3 ed. Roca, 2006. Cap 24, p.495-506.
- Harrus, S., Klement, E., Aroch, I., Stein, T., Bark, H., Lavy, E., Mazaki-Tovi, M., Baneth, G. Retrospective study of 46 cases of feline hemobartonellosis in Israel and their relationship with FeLV and FIV infections. **The Veterinary Record**, v.151, n.3, p.82-85, 2002.
- Harvey, J.W. Hemotropic mycoplasmosis (hemobartonellosis). In: Greene, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 3.ed. Elsevier, 2006. Cap.31, p.252-260.
- Luria, B.J., Levy, J.K., Lappin, M.R., Breutschwerdt, E.B., Legendre, A.M., Hernandez, J.A., Gorman, S.P., Lee, I.T., Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.6, n.5, p.287-296, 2004.
- Maia, L.M.P., Cerqueira, A.M.F., Macieira, D.B., Souza, A.M., Moreira, N.S., Silva, A.V., Messick, J.B., Ferreira, R.F., Almosny, N.R.P. *Cytauxzoon felis* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' coinfection in a Brazilian domestic cat (*Felis catus*). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.22, n.2, 2013.
- Miceli, N.G., Gavioli, F.A., Gonçalves, L.R., André, M.R., Sousa, V.R.F., Sousa, K.C.M., Machado, R.Z. Molecular detection of feline arthropod-borne pathogens in cats in Cuiabá, state of Mato Grosso, central-western region of Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.22, n.3, p.385-390, 2013.

Oliveira, L.S. **Investigação molecular de *Ehrlichia* em uma população de cães e gatos em Viçosa/MG**. Viçosa, 2008. 75f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa.

Robson, M., Crystal, M.A. Bartonellosis. In: Norsworthy, G.D., Grace, S.F., Crystal, M.A., Tilley, L.P. **The Feline Patient**. 4. ed. Wiley-Blackwell, 2011. Cap. 17, p.35-36.

Souza, A.M. **Frequência de infecção por *Bartonella spp.* e alterações sanguíneas em gatos domésticos no Rio de Janeiro - Brasil**. Rio de Janeiro, 2009. 97f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Fluminense.

Souza, H.J.M, Teixeira, C.H.R.T. Leucemia Viral Felina. In: **Coletâneas em Medicina e Cirurgia Felina**. 1.ed. LF-Livros, 2003. Cap. 22. p.251-267.

Sykes, J.E. Feline hemotropic mycoplasmosis (feline hemobartonellosis). **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.33, n.4, p.773-789, 2003.

Sykes, J.E, Drazenovich, N.L., Kyles, A.E., Ball, L.M., Leutenegger, C.M. Detection of mixed infections with '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' and *Mycoplasma haemofelis* using real-time TaqMan polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.19, n.3, p.250-255, 2007.

Tasker, S. Current concepts in feline haemobartonellosis. **In Practice**, v.28, p.136-141, 2006.

Willi, B., Boretti, F.S., Baumgartner, C., Tasker, S., Wenger, B., Cattori, V., Melli, M.L., Reusch, C.E., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R. Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, p.961–969, 2006a.

Willi, B., Tasker, S., Boretti, F.S., Doherr, M.G., Cattori, V., Melli, M.L., Lobetti, R.G., Malik, R., Reusch, C.E., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R. Phylogenetic analysis of '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' isolates from pet cats in the United Kingdom, Australia, and South Africa, with analysis of risk factors for infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.12, p.4430-4435, 2006b.

2. AGENTES INFECCIOSOS E COINFECÇÕES EM GATOS ANÊMICOS E NÃO ANÊMICOS

2.1 RESUMO

A anemia por doença infecciosa em gatos é causada principalmente por retrovírus, hemoparasitas, ou por sua associação. A identificação das coinfeções é importante para avaliar a severidade da doença. Os objetivos deste estudo foram determinar a prevalência de infecções e coinfeções entre retrovírus e hemoparasitas em gatos domésticos anêmicos e não anêmicos; avaliar a correlação entre grau de regeneração da anemia e a presença de coinfeções; a taxa de óbito em relação aos gatos coinfectados; e a ocorrência de outras doenças que não envolvam anemia na presença de infecções e coinfeções. As amostras de sangue foram analisadas pela técnica de PCR em tempo real para os seguintes agentes: *Anaplasma spp.*, *Bartonella spp.*, *Cytauxzoon felis*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma haemofelis*, 'Candidatus Mycoplasma haemominutum', 'Candidatus Mycoplasma turicensis', vírus da imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV); e pelo método de ELISA para FIV e FeLV. Foram avaliadas 142 amostras de sangue de gatos domésticos, sendo 40 doentes anêmicos (grupo I), 50 doentes não anêmicos (grupo II) e 52 saudáveis (grupo III). Do total de amostras, 41,5% (59/142) foram positivas para pelo menos um agente etiológico, sendo que destas, 64,4% (38/59) apresentaram infecção única e 35,6% (21/59) coinfeção. Dentre as coinfeções, foram detectadas duas, três, quatro e cinco infecções. A maior prevalência foi para duas infecções, presente nos três grupos. A coinfeção entre retrovírus e hemoparasita, independente dos agentes, foi a mais prevalente, estando presente em maior quantidade no grupo I. O agente mais prevalente em gatos anêmicos foi o FeLV, presente em 57,5% (23/40) das amostras, e mais da metade dos gatos anêmicos infectados apenas por este agente apresentaram anemia arregenerativa. Coinfeção entre retrovírus e hemoparasita aumenta a severidade da doença. Gatos anêmicos infectados ou coinfectados por hemoparasitas e retrovírus são mais propensos a ir a óbito do que gatos doentes não anêmicos. Os dados do presente estudo revelam uma alta prevalência de hemoparasitas e coinfeções em gatos anêmicos e, ainda, a existência de portadores assintomáticos coinfectados. A identificação destes agentes e suas associações deve ser realizada para estabelecer monitoramento e prognóstico adequados.

Palavras-chave: hemoparasitas, retrovírus, gatos, PCR em tempo real

2.2 ABSTRACT

Infectious diseases in anemic cats are mainly caused by retrovirus, hemoparasites, or its association. The identification of coinfections is important to evaluate the severity of an illness, plan of treatment and adequate monitoring. The objective of this study was to determine the prevalence of coinfection by retrovirus and hemoparasites in anemic and non-anemic domestic cats; to evaluate the correlation between the degree of anemia regeneration and the presence of coinfections; the rate of death compared to coinfecting cats; and the occurrence of other diseases not involving anemia in the presence of infections and coinfections. Blood samples were analyzed using real time PCR technique for the followings agents: *Anaplasma spp.*, *Bartonella spp.*, *Cytauxzoon felis*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma haemofelis*, 'Candidatus Mycoplasma haemominutum', 'Candidatus Mycoplasma turicensis', feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukemia virus (FeLV); and ELISA method for FIV and FeLV. Of the total samples, 41,5% (59/142) were positive for at least one agent, with 64,4% (38/59) presenting single infection and 35,6% (21/59) coinfections. Among coinfections, two, three, four and five infections were detected. The highest prevalence was for two infections, present in all three groups. Coinfection between retroviruses and hemoparasites regardless of which agents, was the most prevalent, being present in high amounts in group I. The most prevalent agent in anemic cats was FeLV present in 57,5% (23/40) of samples, and more than half of anemic cats infected only by this agent showed nonregenerative anemia. Coinfection between retroviruses and hemoparasites increases the severity of the disease. Anemic cats infected or coinfecting by hemoparasites and retroviruses are more likely to die than non-anemic patients cats. Data from this study show a high prevalence of coinfections and hemoparasites in anemic cats and also the existence of asymptomatic coinfecting carriers. The identification of these agents and their associations should be performed to establish adequate monitoring and prognosis.

Key words: hemoparasites, retrovirus, cats, real time PCR

2.3 INTRODUÇÃO

A anemia por doença infecciosa em gatos é um grande desafio na rotina dos clínicos veterinários. É causada principalmente por retrovírus, hemoparasitas, ou pela associação destes. A patogenia dos hemoparasitas pode variar desde casos assintomáticos até a indução de anemia hemolítica grave (Roura et al., 2010). A severidade do quadro clínico varia de acordo com o estado do paciente, virulência do patógeno e com a presença ou não de retrovirose associada, ressaltando a importância do diagnóstico de coinfeções (Museux et al., 2009; Biondo et al., 2009).

A leucemia viral felina (FeLV) é a retrovirose que mais acomete gatos domésticos, e é responsável por alta morbidade e mortalidade nesta espécie animal (Levy, 2004; Greggs et al., 2011). A alteração hematológica mais comum é a anemia, sendo que em 90% dos casos ela é classificada como não regenerativa (Hartmann, 2011; 2012). O vírus pode causar supressão da medula óssea, imunodepressão, doenças imunomediadas, desordens neurológicas e algumas vezes neoplasias (principalmente linfoma) (Greggs et al., 2011; Hartmann, 2012). A severidade e o tipo da doença dependem das características genéticas das variantes do vírus e da imunidade do hospedeiro (Souza & Teixeira, 2003; Hartmann, 2012).

No Brasil, os hemoparasitas de gatos domésticos são pouco relatados e coinfeções foram descritas apenas em alguns estados (Batista, 2004; Hora, 2008; Santos, 2008; Macieira et al., 2008; Bortoli et al., 2012; Aragão-de-Souza et al., 2013; Miceli et al., 2013). A natureza inespecífica dos sinais clínicos em gatos infectados associados à baixa sensibilidade e especificidade da técnica do esfregaço sanguíneo podem ter resultado no subdiagnóstico desses parasitas no Brasil (Oliveira, 2008).

O diagnóstico de agentes infecciosos baseado em métodos moleculares tem demonstrado maior sensibilidade e especificidade em comparação a outros, como sorológicos e de imunofluorescência para os retrovírus, e hematoscopia para hemoparasitas. Entre estes, o PCR em tempo real apresenta diversas vantagens em relação ao PCR convencional. É altamente específico, devido ao uso de um terceiro nucleotídeo (uma sonda marcada com reagente fluorescente), é extremamente rápido quando comparado à técnica previamente citada, e o risco de contaminação e resultados falso-positivos são baixos devido a técnica ser realizada em sistema de tubos fechados (Willi et al., 2007; Biondo et al., 2009).

Os objetivos deste estudo foram: determinar a prevalência de infecções e coinfeções entre retrovírus e hemoparasitas em gatos domésticos anêmicos e não anêmicos; avaliar a correlação entre grau de regeneração da anemia e a presença de coinfeções; a taxa de óbito

em relação aos gatos coinfectados; e avaliar a ocorrência de outras doenças que não envolvam anemia na presença de infecções e coinfecções.

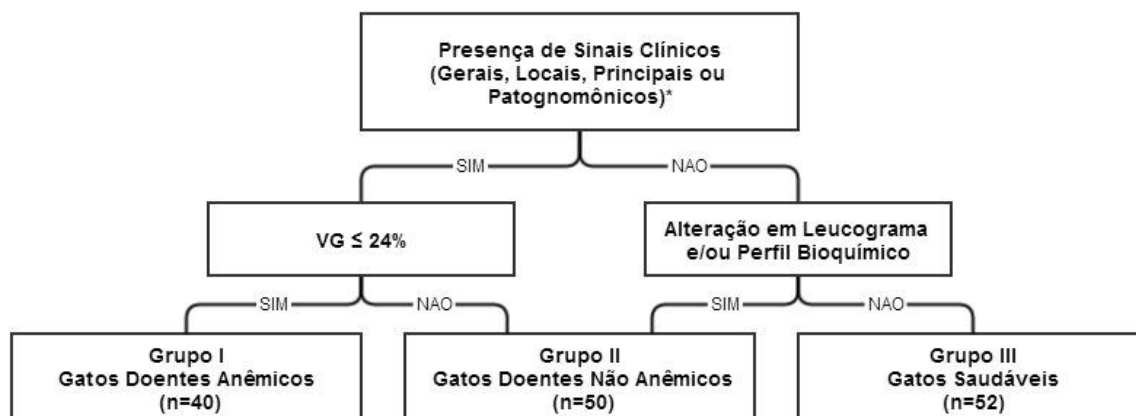
2.4 MATERIAL E MÉTODOS

2.4.1 Animais

Neste estudo foram avaliadas 142 amostras de sangue de gatos. Os gatos foram atendidos na rotina clínica particular de Curitiba/PR e o critério de seleção foi a idade, a qual deveria ser acima de seis meses. Este critério deve-se à possibilidade de resultados falso-positivos para FIV pela técnica de ELISA, a qual detecta anticorpos contra o vírus, e nesta faixa etária é possível ocorrer positividade em filhotes nascidos de gatas infectadas por FIV devido à presença de anticorpos maternos circulantes MDA (*maternally derived antibody*) (Harbour et al., 2006).

Os gatos foram divididos em três grupos: grupo I – gatos doentes anêmicos (n=40), grupo II – gatos doentes não anêmicos (n=50) e grupo III – gatos saudáveis (n=52), de acordo com os sinais clínicos observados pelo proprietário e/ou veterinário durante o exame físico, associados aos resultados dos exames laboratoriais (Quadro 1). O exame físico consistiu em avaliação de: mucosas, cavidade oral, olhos, ouvidos, hidratação, aspecto da pelagem, tamanho dos linfonodos, temperatura, comportamento (apático/alerta), ausculta cardíaca e pulmonar, e palpação abdominal. Os exames laboratoriais realizados foram: hemograma, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase, fósforo, potássio, uréia, creatinina, proteínas totais e frações, bilirrubinas totais e frações. O grau de regeneração da anemia foi avaliado pela contagem de reticulócitos, considerando arregeneração em contagem < 0,4%, regeneração leve em 0,5 – 2,0%, moderada em 3,0 - 4,0% e marcada > 5,0% (Weiss & Wardrop; 2010).

Quadro 1. Algoritmo da classificação dos gatos em grupos de acordo com os sinais clínicos e exames laboratoriais.



* Feitosa, F.L.F. (2008)

2.4.2 Amostras

As amostras de sangue foram coletadas por venopunção da jugular, de forma asséptica (utilização de material descartável), armazenando 2ml de sangue em tubo com anticoagulante EDTA e 3ml em tubo sem EDTA. As amostras com anticoagulante foram utilizadas para realização do hemograma e do PCR em tempo real, e as amostras sem anticoagulante foram centrifugadas por 5 minutos à 5000 rpm e o soro separado para as provas bioquímicas e sorológicas. Este material foi acondicionado em caixas de isopor sob refrigeração e encaminhado para a IDEXX Laboratories, Inc., em Sacramento/CA, Estados Unidos, para as análises por PCR em tempo real e ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*).

Foram também coletadas amostras de sangue por punção capilar da ponta de orelha para confecção dos esfregaços. As lâminas com os esfregaços sanguíneos foram coradas com Panótico Rápido (Newprov®). Para a contagem de reticulócitos, foram realizados esfregaços com sangue diluído em corante azul de cresil brilhante, sendo contra-corado com MGG (May-Grunwald-Giemsa). Todas as lâminas foram examinadas em Microscópio Óptico no aumento de 1.000 vezes.

As contagens de eritrócitos, plaquetas, leucócitos e concentração de hemoglobina foram executadas em contador automático de células sanguíneas da marca Mindray®, modelo BC 2800 VET. As análises bioquímicas foram feitas no aparelho bioquímico automático da marca Mindray®, modelo BS-200.

2.4.3 PCR em tempo real e ELISA

Realizou-se um painel de detecção de patógenos pela técnica do PCR em tempo real para os seguintes agentes: *Anaplasma spp.*, *Bartonella spp.*, *Cytauxzoon felis*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma haemofelis*, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', '*Candidatus Mycoplasma turicensis*', vírus da imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV); e pelo método de ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*) para detecção de anticorpos contra FIV e antígeno (proteína nuclear p27) da FeLV. A técnica de ELISA foi realizada em um *kit* comercial (*Snap combo felino* - IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, EUA).

A técnica de PCR em tempo real foi validada analítica e clinicamente, e baseada na plataforma de serviços de propriedade da IDEXX RealPCR™ (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA). A extração de ácidos nucleicos foi realizada de acordo com o *kit* comercial *Corbett XTractor-Gene* (Qiagen, Valencia, CA, EUA). O gene *housekeeping* (18S rRNA) foi usado para determinar a quantidade de DNA e cDNA após a transcrição reversa e para confirmar a integridade do DNA. Regiões de nucleotídeos conservadas foram selecionadas e dois *primers* e uma sonda de hidrólise foram designados para a hibridização desses nucleotídeos, usando um *software* comercial (*PrimerExpress Version 3.0*, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Além disso, dois *primers* juntos ao fragmento amplificado na técnica de PCR em tempo real foram designados para verificar as sequências. O PCR em tempo real foi realizado com um *primer* padrão e concentrações de sonda usando um *mastermix* disponível comercialmente (LC480 *ProbesMaster*, Roche Applied Science, Indianapolis, IN, EUA) na plataforma de PCR disponível comercialmente (Roche LightCycler 480). A IDEXX Laboratories não fornece informações a respeito dos *primers* e sondas por razões de segredo de comércio. A fim de reproduzir os resultados desse estudo, os testes podem ser adquiridos por esta empresa mencionando os nomes dos testes conforme descrito neste artigo.

2.4.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo teste do qui-quadrado (para $n > 20$) ou exato de fisher (para $n \leq 20$). Foi utilizado o programa BioEstat 5.3, considerando o nível de significância de 95% ($P < 0,05$).

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo da prevalência de infecções e coinfeções; grau de regeneração da anemia e taxa de óbito; relação entre outras doenças e presença de infecções

e coinfeções; hematoscopia; e comparação de técnicas realizadas na detecção de retrovírus; estão apresentados nos tópicos a seguir.

2.5.1 Prevalência de infecções e coinfeções

Do total de amostras, 41,5% (59/142) foram positivas para pelo menos um agente etiológico, destes 64,4% (38/59) apresentaram infecção única e 35,6% (21/59) coinfeção. Os grupos I e II apresentaram diferença estatística para infecção geral (positividade para pelo menos um agente) ($P=0,007$) e para coinfeção geral em relação ao grupo III ($P<0,0001$). O grupo I apresentou diferença estatística para infecção única em relação ao grupo III ($P=0,006$), no entanto não houve diferença significativa entre os grupos II e III para este fator (Tabela 1).

Das infecções únicas no grupo I verificou-se maior prevalência para todos os agentes (Tabela 1), e o retrovírus FeLV foi detectado em 88,2% (15/17) (Tabela 2). Nenhum gato anêmico apresentou infecção única por FIV. Dois gatos deste grupo apresentaram infecção única por hemoparasitas, sendo um por *M. haemofelis* e outro por '*Candidatus M. haemominutum*' (Tabela 2).

Dentre as coinfeções, foram detectadas duas, três, quatro e cinco infecções (Tabela 1). A maior prevalência foi para duas infecções, presente nos três grupos. A coinfeção entre retrovírus e hemoparasita, independente dos agentes, foi a mais prevalente, estando presente em maior quantidade no grupo I (Tabela 2).

Tabela 1. Prevalência de infecções e coinfeções e pelos hemoparasitas: *Anaplasma spp.*, *Bartonella spp.*, *Cytauxzoon felis*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma haemofelis*, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', '*Candidatus Mycoplasma turicensis*', detectados por PCR em tempo real; e retrovírus FIV e FeLV, detectados por PCR em tempo real e/ou ELISA, em gatos domésticos (Curitiba/PR, Brasil).

Infecção	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Valor de P	Total (n=142)
	Gatos doentes anêmicos (n=40)	Gatos doentes não anêmicos (n=50)	Gatos saudáveis (n=52)		
	Prevalência %				
Infecção Geral	67,5% (27/40)	46% (23/50)	17,3% (9/52)	< 0,0001	41,5% (59/142)
Infecção Única	63% (17/27)	60,9% (14/23)	77,8% (7/9)	0,006	64,4% (38/59)
Coinfecção Geral	37% (10/27)	39,1% (9/23)	22,2% (2/9)	0,007	35,6% (21/59)
Duas Infecções	60% (6/10)	88,9% (8/9)	100% (2/2)	----	76,2% (16/21)
Três Infecções	10% (1/10)	11,1% (1/9)	Nenhuma	----	9,5% (2/21)
Quatro Infecções	20% (2/10)	Nenhuma	Nenhuma	----	9,5% (2/21)
Cinco Infecções	10% (1/10)	Nenhuma	Nenhuma	----	4,8% (1/21)

Tabela 2. Associação entre os hemoparasitas *Anaplasma spp.*, *Bartonella spp.*, *Cytauxzoon felis*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma haemofelis*, ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’, ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’, detectados por PCR em tempo real; e retrovírus FIV e FeLV, detectados por PCR em tempo real e/ou ELISA, em gatos domésticos (Curitiba/PR, Brasil).

Infecção	Grupo I Gatos doentes anêmicos (n=40)	Grupo II Gatos doentes não anêmicos (n=50)	Grupo III Gatos saudáveis (n=52)	Valor de P
Infecção Única	42,5% (17/40)	28% (14/50)	13,5% (7/52)	0,006
Retrovírus	88,2% (15/17)	78,6% (11/14)	28,6% (2/7)	0.0121
Hemoparasita	11,8% (2/17)	21,4% (3/14)	71,4% (5/7)	0.0121
Coinfecção	25% (10/40)	18% (9/50)	3,8% (2/52)	0,007
Retrovírus e Hemoparasita	80% (8/10)	66,7% (6/9)	Nenhuma	0,1143
Retrovírus e Retrovírus	10% (1/10)	11,2% (1/9)	50% (1/2)	0,4248
Hemoparasita e Hemoparasita	10% (1/10)	22,2% (2/9)	50% (1/2)	0,2731

O agente mais prevalente tanto nas infecções quanto nas coinfecções foi o FeLV, estando presente em 28,9% (41/142) das amostras (Tabela 3). A prevalência de FeLV no Brasil é de difícil determinação devido à variedade de técnicas aplicadas e às diferenças nas populações de gatos ligadas aos fatores de risco. Estudos de diversos estados brasileiros encontraram prevalência variando entre 0,36% e 38,3% (Barbosa et al., 2001; Souza et al., 2002; Silva, 2007; Teixeira et al., 2007; Coelho et al., 2008; Meinerz et al., 2010; Santos, 2012). Nas coinfecções, o FeLV foi associado com ‘*Candidatus M. haemominutum*’ em 60% (6/10) dos gatos do grupo I. No grupo II, o FeLV estava associado com *Bartonella spp.* e ‘*Candidatus M. haemominutum*’ em mesmas proporções, e com ‘*Candidatus M. turicensis*’ em 22,2 % (2/9).

O segundo agente mais prevalente neste estudo foi o ‘*Candidatus M. haemominutum*’, positivo em 13,4% (19/142) das amostras; e o terceiro, o ‘*Candidatus M. turicensis*’, em 5,6% (8/142) (Tabela 3). A prevalência de *M. haemofelis* foi de 4,9% (7/142). A prevalência dos hemoplasmas no Brasil já foi avaliada no Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Pará e Cuiabá, todas utilizando PCR convencional. As prevalências variaram de 6,7% a 13,5% para o ‘*Candidatus M. haemominutum*’, de 0,37% a 12,93% para o ‘*Candidatus M. turicensis*’ e de 1,49% a 37,8% para o *M. haemofelis* (Batista, 2004; Baumann et al., 2006; Santos, 2008; Hora, 2008; Macieira et al., 2008; Bortoli et al., 2012; Miceli et al., 2013; Aragão-de-Souza et al., 2013) (Tabela 4).

No grupo I, o resultado de prevalência de 22,5% (9/40) para ‘*Candidatus M. haemominutum*’ e 10% (4/40) para *M. haemofelis*, diferem de um estudo previamente realizado por Baumann et al. (2006), na mesma cidade do presente estudo, que verificaram maior prevalência do *M. haemofelis* 37,8% (14/37) em relação ao ‘*Candidatus M. haemominutum*’

10,8% (4/37) em gatos anêmicos, utilizando PCR convencional. A discrepância entre os resultados anteriores e os do presente trabalho pode estar relacionada à diferença de fatores de risco entre as populações estudadas e métodos de diagnóstico utilizados.

No presente estudo, o '*Candidatus M. haemominutum*' apresentou associação com FeLV em 31,6% (6/19), e com FIV e FeLV em 10,5% (2/19) das amostras. Segundo alguns pesquisadores, o '*Candidatus M. haemominutum*' é mais comum em associação com FIV, ou FIV e FeLV, do que em gatos negativos para as retrovirose (Luria et al., 2004; Hora, 2008; Macieira, 2008), porém não foi observado este fato neste estudo.

Tabela 3. Prevalência de infecções por hemoparasitas, detectados por PCR em tempo real, e retrovírus, detectados por PCR em tempo real e/ou ELISA, em gatos domésticos (Curitiba/PR, Brasil).

Patógeno	Grupo I Gatos doentes anêmicos (n=40)	Grupo II Gatos doentes não anêmicos (n=50)	Grupo III Gatos saudáveis (n=52)	Valor de P	Total (n=142)
Prevalência %					
<i>Anaplasma spp.</i>	0% (0/40)	0% (0/50)	0% (0/52)	---	0% (0/142)
<i>Bartonella spp.</i>	2,5% (1/40)	4% (2/50)	1,9% (1/52)	0,8366	2,8% (4/142)
<i>Cytauxzoon felis</i>	0% (0/40)	0% (0/50)	0% (0/52)	---	0% (0/142)
<i>Ehrlichia spp.</i>	2,5% (1/40)	0% (0/50)	1,9% (1/52)	0,7402	1,4% (2/142)
<i>M. haemofelis</i>	10% (4/40)	4% (2/50)	1,9% (1/52)	0,2595	4,9% (7/142)
<i>Candidatus M. haemominutum</i>	22,5% (9/40)	12% (6/50)	7,7% (4/52)	0,1209	13,4% (19/142)
<i>'Candidatus M. turicensis'</i>	10% (4/40)	8% (4/50)	0% (0/52)	0,0423	5,6% (8/142)
FIV	7,5% (3/40)	6% (3/50)	3,8% (2/52)	0,7424	5,6% (8/142)
FeLV	57,5% (23/40)	32% (16/50)	3,8% (2/52)	< 0,001	28,9% (41/142)

A prevalência para *Bartonella spp.* foi de 2,8% (4/142) (Tabela 3). Estudos realizados em gatos de abrigo no Rio de Janeiro, Brasil, encontraram prevalências de 17,02% e 97,3% (gatos saudáveis) para *Bartonella spp.*, utilizando PCR convencional (Souza et al., 2010; Staggemeier et al.; 2010). Em outros estados do Brasil, utilizando a mesma técnica, as prevalências variaram de 2,2% (Cuiabá) a 42,5% (Rio de Janeiro) (Souza, 2009; Crissiuma et al., 2011; Bortolli et al., 2012; Braga et al., 2012a; Miceli et al., 2013) (Tabela 4).

A *Ehrlichia spp.* foi encontrada em 1,4% (2/142) das amostras. Em Viçosa, Minas Gerais (Brasil), em 20% (3/15) dos gatos, sendo dois saudáveis e um com cistite, detectou-se *E. canis* por *nested*-PCR (Oliveira, 2008), sendo maior que a encontrada no presente estudo (Tabela 4). Em Cuiabá, Braga et al. (2013), a *Ehrlichia spp.* foi avaliada por PCR em 93 gatos e 8,6% foram positivos para *E. canis* (Tabela 4). Em São Luiz do Maranhão, a prevalência de 1%, de 200 gatos, foi encontrada para *Ehrlichia spp.* por PCR (Tabela 4) (Braga et al., 2012b), e os

autores sugerem que a baixa prevalência de *Ehrlichia spp.* ocorreu devido à uma possível resistência dos animais ao parasito e devido a interação diferente com o carrapato, quando comparada aos cães.

No presente estudo não houve positividade para *Cytauxzoon felis* e *Anaplasma spp.* em nenhum grupo. Existem poucos relatos sobre esses parasitas no Brasil. A cytauxoonose foi descrita em felídeos selvagens brasileiros (Peixoto et al., 2007; André et al.; 2009; Filoni et al., 2011) e em uma colônia de gatos ferais de um Zoológico no Rio de Janeiro (Mendes-de-Almeida et al., 2007). Recentemente foi relatado um caso de um gato doméstico naturalmente coinfetado com *Cytauxzoon felis* e '*Candidatus M. haemominutum*' no Rio de Janeiro (Maia et al., 2013). Em Recife (PE), foi encontrado um caso de um gato doente infectado por *Anaplasma platys* diagnosticado por PCR, porém o parasita não foi associado à doença clínica (Lima et al., 2010). Em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 40% (2/5) de gatos anêmicos e 11,63% (10/86) de não anêmicos, foram positivos na *nested*-PCR para *Anaplasma platys* (Correa et al., 2011) (Tabela 4).

A prevalência para FIV neste estudo foi de 5,6% (8/142), semelhante a encontrada por Teixeira et al. (2007), 4,14% (6/145), em gatos domésticos de Belo Horizonte, por PCR convencional. Em outros estados brasileiros, em estudos utilizando PCR convencional, a prevalência varia de 0,78% (São Paulo) a 37,5% (Rio Grande do Sul) (Caldas et al., 2000; Caxito et al., 2003; Silva, 2007; Santos, 2012) (Tabela 4).

Tabela 4. Prevalência de infecções por hemoparasitas, detectados por PCR em tempo real, e retrovírus, detectados por PCR em tempo real e/ou ELISA, em gatos domésticos no Brasil.

Patógeno	PR	RS	SP	MG	RJ	MA	PA	MT
<i>Anaplasma spp.</i>	0%*	-	-	-	13,2%	-	-	-
<i>Bartonella spp.</i>	2,8%*	-	-	-	17,02% - 97,3%	-	-	2,2%
<i>Cytauxzoon felis</i>	0%*	-	-	-	-	-	-	0%
<i>Ehrlichia spp.</i>	1,4%*	-	-	30%	-	2%	-	8,6%
<i>Mycoplasma haemofelis</i>	4,9%* - 37,8%	2,7%	7,14% - 8,5%	-	4%	-	1,49%	2,2%
' <i>Candidatus M. haemominutum</i> '	10,8% - 13,4%*	13,5%	2,6% - 4,3%	-	10%	-	7,96%	6,7%
' <i>Candidatus M. turicensis</i> '	5,6%*	2,2%	0,37% - 2,2%	-	-	-	12,93%	0,5%
FIV	5,6%*	21,5%- 37,5%	0,78%	2,7% - 4,14%	-	-	-	-
FeLV	28,9%*	10,8%	0,36%	12,59%	17,4%	-	-	-

* Dados obtidos no presente estudo.

Dos gatos saudáveis coinfetados, um estava infectado pelos retrovírus FIV e FeLV e outro pelos hemoparasitas *M. haemofelis* e '*Candidatus M. haemominutum*'. Segundo Harvey (2006), gatos saudáveis infectados por hemoplasmas parecem viver em estágio balanceado, no qual a replicação dos organismos está em equilíbrio com a fagocitose e remoção dos

mesmos, apesar de que a reativação da infecção pode ocorrer e resultar em doença clínica. No caso dos retrovírus, estágios assintomáticos da doença já foram descritos (Costa & Norsworthy, 2011; Grace, 2011).

2.5.2 Grau de regeneração da anemia e taxa de óbito

Em relação ao grau de anemia, 60% (9/15) dos gatos infectados unicamente por FeLV apresentaram anemia arregenerativa. Os dois gatos com infecção única por hemoparasitas apresentaram anemia regenerativa leve. Dos gatos coinfectados, 87,5% (7/8), apresentaram associação entre retrovírus e hemoparasita e anemia arregenerativa, confirmando que a coinfeção entre retrovírus e hemoparasita tende a agravar o quadro clínico do paciente (Harvey, 2006; Sykes et al., 2008; Nibblett et al., 2009). Em 83,3% (5/6) dos gatos coinfectados com dois, três e quatro agentes observou-se anemia arregenerativa; no entanto, o gato que estava coinfectado com cinco agentes apresentou anemia regenerativa leve.

A taxa de óbito foi comparada entre o grupo I e o grupo II. O grupo I apresentou maior prevalência de óbitos na taxa de infecção geral (positividade para qualquer agente), na taxa de coinfeção geral (presença dois ou mais agentes) e nas infecções únicas por retrovírus.

2.5.3 Relação entre doenças e infecções por hemoparasitas e retrovírus

A prevalência de doenças nos grupos dos gatos doentes anêmicos (grupo I) e dos doentes não anêmicos (grupo II) está apresentada na tabela 5. Não houve diferença estatística para as doenças observadas entre os grupos. No entanto, ressalta-se a maior prevalência para doenças infecciosas (ex.: PIF, FIV, FeLV, Hemoparasita, Esporotricose) no grupo I ($P=0,051$).

Não houve diferença estatística para a presença de coinfeções entre hemoparasitas e retrovírus, e nem de infecções únicas por hemoparasitas, infecções únicas por retrovírus, e as doenças observadas.

Tabela 5. Prevalência de doenças em infecções por *Anaplasma spp.*, *Bartonella spp.*, *Cytauxzoon felis*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma haemofelis*, 'Candidatus Mycoplasma haemominutum', 'Candidatus Mycoplasma turicensis', detectados por PCR em tempo real; e retrovírus FIV e FeLV, detectados por PCR em tempo real e/ou ELISA, em gatos domésticos, considerando o órgão/sistema envolvido (Curitiba/PR, Brasil).

Doença	Grupo I	Grupo II	Valor de P
	Gatos doentes anêmicos (n=40)	Gatos doentes não anêmicos (n=50)	
	Prevalência %		
Multifatorial	7,5% (3/40)	10% (5/50)	0,7284
Inespecífica	7,5% (3/40)	16% (8/50)	0,3337
Infecciosa	52,5% (21/40)	30% (15/50)	0,051

Trato Urinário	12,5% (5/40)	6% (3/50)	0,4584
Trato Gastrointestinal	10% (4/40)	12% (6/50)	0,7642
Trato Respiratório	0% (0/40)	6% (3/50)	0,2509
Neoplasia	7,5% (3/40)	0% (0/50)	0,0840
Politraumatismo	2,5% (1/40)	2% (1/50)	1
Ortopédica	0% (0/40)	2% (1/50)	1
Periodontal	0% (0/40)	4% (2/50)	0,5006
Dermatológica	0% (0/40)	4% (2/50)	0,5006
Oftalmológica	0% (0/40)	2% (1/50)	1
Neurológica	0% (0/40)	4% (2/50)	0,5006
Auto-Imune	0% (0/50)	2% (1/50)	1

2.5.4 Hematoscopia

Em 10% (4/40) dos gatos anêmicos, verificaram-se inclusões de hemoplasmas na hematoscopia, todas positivas também por PCR em tempo real. Esse dado condiz com os achados de Tasker et al. (2003), que relataram sensibilidade de menos de 20% para este método. Segundo Dawoud et al. (2008), para se detectar um hemoparasita na avaliação microscópica é necessário aproximadamente 1.000 parasitas/μl de sangue. A utilização de técnicas moleculares como o PCR aumentam a sensibilidade diagnóstica, pois são capazes de obter resultados positivos com apenas 1 parasita/μl. Além disso, devido à característica cíclica da parasitemia, a hematoscopia não é uma técnica sensível e nem específica para o diagnóstico dessas infecções. Segundo Biondo et al. (2009), técnicas envolvendo biologia molecular como o PCR em tempo real tem sido usadas com sucesso para o diagnóstico de infecções de hemoplasmas tanto agudas quanto crônicas.

2.5.5 Comparação das técnicas realizadas no diagnóstico de retrovirose

Com relação às técnicas realizadas para detecção dos retrovírus, foram positivos para FeLV no qPCR e negativas no ELISA, 12,5% (5/40) dos gatos doentes anêmicos, 2% (1/50) dos doentes não anêmicos e 1,9% (1/52) dos saudáveis. Segundo Souza & Teixeira (2003), há três razões principais para o teste de ELISA apresentar um resultado negativo: 1- ausência de infecção, pela não exposição ao vírus ou pelo desenvolvimento de anticorpos neutralizantes e eliminação da infecção; 2- na ocorrência de uma infecção pré-aguda; 3- quando ocorreu eliminação do vírus no soro, mas está sob infecção latente. Acredita-se que, neste trabalho, provavelmente estes gatos se enquadram em uma das duas últimas razões, devido à positividade na qPCR, a qual é mais sensível para detectar tanto em infecções recentes quanto latentes (Souza & Teixeira, 2003).

Dos gatos infectados por FIV, foram positivos apenas no qPCR 2,5% (1/40) dos doentes anêmicos e 1,9% (1/52) dos saudáveis. De acordo com Harbour et al. (2006) o PCR é uma

técnica mais sensível para detectar níveis muito baixos de vírus no sangue ou em tecidos, e o qPCR possui também como vantagem reduzir o risco de contaminação cruzada, aumentando a especificidade do teste. Esta informação pode explicar a positividade dos gatos saudáveis apenas por esta técnica. Com relação ao gato positivo apenas na técnica de ELISA, o mesmo autor ressalta que esta técnica pode resultar em falsos-positivos e recomenda que outras técnicas sejam aplicadas para confirmar ou não a infecção. Hartmann (2005) afirma que um dos motivos de um resultado falso-positivo é a aplicação de vacinas, porém estas não são disponíveis ainda no Brasil. Afirma ainda que nestes casos deve-se considerar repetir o teste em 6 meses se o paciente apresenta sinais sugestivos de FIV.

2.6 CONCLUSÃO

Esta é a primeira identificação de '*Candidatus M. turicensis*', *Ehrlichia spp.* e *Bartonella spp.* em gatos domésticos no Paraná. Gatos saudáveis podem ser portadores assintomáticos coinfectados por hemoparasitas ou retrovírus, exigindo monitoramento pois a reativação da infecção pode ocorrer e resultar em doença clínica.

Gatos anêmicos apresentam alta prevalência de infecções, assim como de coinfeções, podendo apresentar associação de até cinco patógenos. Ainda, gatos anêmicos infectados ou coinfectados por hemoparasitas e retrovírus são mais propensos a ir a óbito do que gatos doentes não anêmicos.

O agente mais prevalente em gatos anêmicos no presente estudo foi o FeLV e mais da metade dos gatos anêmicos infectados apenas por este agente apresentaram anemia arregenerativa. Quando em associação com hemoparasitas, anemia arregenerativa foi encontrada em mais de 80% dos infectados, sugerindo que a coinfeção entre retrovírus e hemoparasita tende a agravar o quadro clínico do paciente. A principal associação ocorreu com o hemoparasita '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*'.

Considerando que todos os agentes infecciosos pesquisados são potenciais patógenos causadores de anemia, a identificação destes e suas associações deve ser realizada para estabelecer monitoramento e prognóstico adequados.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

O protocolo de número 047/2012 referente a este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em Curitiba, Paraná, Brasil.

AGRADECIMENTOS

À IDEXX Laboratories, Inc., pela análise das amostras pela técnica de PCR em tempo real e ELISA. À Médica Veterinária Bianca Ricci Borba, do Hospital Veterinário do Batel, e ao Médico Veterinário Marcelus Natal Sanson, do Hospital Veterinário Clinivet, por cederem amostras para este projeto.

REFERÊNCIAS

Almosny, N.R.P., Massard, C.L., Erliquiose em pequenos animais domésticos e como zoonose. In: Almosny, N.R.P. **Hemoparasitoses em Pequenos Animais Domésticos e como Zoonoses**. L.F. Livros, 2002, p.14-56.

André, M.R., Adania, C.H., Machado, R.Z., Allegretti, S.M., Felipe, P.A.N., Silva, K.F., Nakaghi, A.C.H., Dagnone, A.S. Molecular detection of *Cytauxzoon* spp. in asymptomatic brazilian wild captive felids. **Journal of Wildlife Diseases**, v.45, n.1, p.234-237, 2009.

Aragão-de-Sousa S.K.S., Sampaio-Junior F.D., Sousa L.O., Santos R.C., Gonçalves E.C., Scofield A., Góes-Cavalcante G. Molecular diagnosis of haemoplasmas infection in naturally infected domestic cats from Belém, Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.9, p.1116-1120, 2013.

Barbosa, F.C, Cristino, F., Tulio, M.P., Andrade, K.C. Prevalência da leucemia felina em gatos domésticos de Uberlândia - MG. **Arquivo Ciência Veterinária e Zoologia - UNIPAR**, v.5, n.2, p.207-211, 2001.

Batista, T. N. **Frequência de infecção do *Mycoplasma haemofelis* e ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ em gatos (*Felis catus*)**. Botucatu, 2004. 44f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Baumann, A., Guimaraes, A.M.S, Silva, C.C., Yamaguti, M., Kozemjakim, D.A., Messik, J.B., Biondo, A.W., Timenetsky, J. *Mycoplasma haemofelis* and ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ detection by PCR in anemic domestic cats (*Felis Catus*) from Curitiba, Brazil: a preliminary study. In: **Abstracts of the American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) 41st. Annual Meeting, 2006, Tucson**. Veterinary clinical pathology. Davis: American Society for Veterinary Clinical Pathology, 2006, v.35, p.370.

Biondo, A.W., Santos, A.P., Guimarães, A.M.S., Vieira, R.F.C., Vidotto, O., Macieira, D.B., Almosny, N.R.P., Molento, M.B., Timenetsky, J., Morais, H.A., Gonzáles, F.H.D., Messik, J.B. A review of the occurrence of hemoplasmas (hemotrophic mycoplasmas) in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, n.3, p.1-7, 2009.

Bortoli, C.P., André, M.R., Seki, M.C., Pinto, A.A., Machado, S.T.Z., Machado, R.Z. Detection of hemoplasma and *Bartonella* species and co-infection with retroviruses in cats subjected to a spaying/neutering program in Jaboticabal, SP, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.21, n.3, p.219-223, 2012.

Braga, M.S.C.O., Diniz, P.P.V.P., André, M.R., Bortoli, C.P., Machado, R.Z. Molecular characterization of *Bartonella* species in cats from São Luís, state of Maranhão, northeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.107, n.6, p.772-777, 2012a.

Braga, M.S.C.O., André, M.R., Freschi, C.R., Teixeira, M.C.A., Machado, R.Z. Molecular and serological detection of *Ehrlichia* spp. in cats on São Luiz Island, Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.21, n.1, p.37-41, 2012b.

Braga, I.A., Santos, L.G.F., Melo, A.L.T., Jaune, F.W., Ziliani, T.F., Girardi, A.F., Aguiar, D.M. Hematological values associated to the serological and molecular suspected of *Ehrlichia canis* infection. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.22, n.4, p.470-474, 2013.

Caldas, A.P.F.; Leal, E.S.; Silva, E.F.A. et al. Detecção do provírus da Imunodeficiência Felina em gatos domésticos pela técnica de reação em cadeia da polimerase. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.20, p.20-25, 2000.

Caxito, F.A. **Detecção e subtipagem do vírus da imunodeficiência felina em Minas Gerais**. 2003. 90f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Coelho, F.M. Naturally occurring feline leukemia virus subgroup A and B infections in urban domestic cats. **Journal of General Virology**, v.89, p.2799-2805, 2008.

Correa, E.S., Paludo, G.R., Scaloni, M.C., Machado, J.A., Lima, A.C.Q., Pinto, A.T.B., Thiebaut, J.T.L., Albernaz, A.P. Investigação molecular de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma platys* em felinos domésticos: alterações clínicas, hematológicas, bioquímicas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.10, p.899-909, 2011.

Crissiuma, A., Favacho, A., Gershony, L., Mendes-de-Almeida, F., Gomes, R., Mares-Guia, A., Rozental, T., Barreira, J., Lemos, E., Labarthe, N. Prevalence of *Bartonella* species DNA and antibodies in cats (*Felis catus*) submitted to a spay/neuter program in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.13, p.149-151, 2011.

Dawoud, H.A., Ageely, H.M., Heiba, A.A. Comparison of two commercial assays and microscopy with PCR for diagnosis of malaria. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v.38, p.329-338, 2008.

Feitosa, F.L.F. **Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico**. 2.ed. Roca, 2008. 735p.

Filoni, C., Catão-Dias, J.L., Cattori, V., Wili, B., Meli, M.L., Correa, S.H.R., Marques, M.C., Adania, C.H., Silva, J.C.R., Marvulo, M.F.V., Neto, J.S.F., Durigon, E.L., Carvalho, V.M., Coutinho, S.D., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R. Surveillance using serological and molecular methods for the detection of infectious agents in captive Brazilian neotropical and exotic felids. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.24, n.1, p.166-173, 2011.

Greggs, W.M., Clouser, C.L., Patterson, S.E., Mansky, L.M. Broadening the use of antiretroviral therapy: the case for feline leukemia virus. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v.7, p.115-122, 2011.

Harbour, D.A., Caney, S.M.A., Sparkes, A.H. Infecção pelo vírus da Imunodeficiência Felina. In: **Clínica e Terapêutica em Felinos**. 3.ed. Roca, 2006. Cap.24, p.495-506.

Hartmann, K. Feline Immunodeficiency Infection and Related Diseases. In: Ettinger, S.J., Feldman, E.C. **Veterinary Internal Medicine**. 6.ed. Elsevier Saunders, 2005. v.1. Cap.171. p.659-662.

Hartmann, K. Clinical aspects of feline immunodeficiency and feline leukemia virus infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.143, p.190-201, 2011.

Hartmann, K. Clinical aspects of feline retroviruses: A review. **Viruses**, v.4, p.2684-2710, 2012.

Harvey, J.W. Hemotrophic mycoplasmosis (hemobartonelosis). In: Greene, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 3 ed. Elsevier, 2006. Cap.31, p.252-260.

Hora, A. S. **Associação da infecção por *Mycoplasma haemofelis* e os vírus da leucemia e imunodeficiência em felinos anêmicos**. São Paulo, 2008. 115f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo.

Levy J.K., 2004. VLF e doença não-neoplásica relacionada. In: Ettinger S.J. & Feldman E.C. **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. 5.ed. Guanabara Koogan, 2004. Cap.89, p.446-455.

Lima, M.L.F., Soares, P.T., Ramos, C.A.N., Araújo, F.R., Ramos, R.A.N., Souza, I.I.F., Faustino, M.A.G., Alves, L.C.A. Molecular detection of *Anaplasma platys* in a naturally-infected cat in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.381-385, 2010.

Luria, B.J., Levy, J.K., Lappin, M.R., Breitschwerdt, E.B., Legendre, A.M., Hernandez, J.A., Gorman, S.P., Lee, I.T., Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.6, n.5, p.287-296, 2004.

Macieira, D. B. **Hemoplasmas em gatos domésticos: prevalência e sua associação à infecção natural pelos vírus das imunodeficiência e/ou leucemia felinas**. Seropédica, 2008. 90f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Maia, L.M.P., Cerqueira, A.M.F., Macieira, D.B., Souza, A.M., Moreira, N.S., Silva, A.V., Messick, J.B., Ferreira, R.F., Almosny, N.R.P. *Cytauxzoon felis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' coinfection in a Brazilian domestic cat (*Felis catus*). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.22, n.2, 2013.

Meinerz, A.R.M; Antunes, T.A., De Souza, L.L., Nascente, P.S., De Faria, R.O., Cleff, M.B., Gomes, F.R., Nobre, M.O., Reishak, D., Schuch, L.F.D., Meireles, M.C.A. Frequência do vírus da leucemia felina (VLFe) em felinos domésticos (*Felis catus*) semidomiciliados nos municípios de Pelotas e Rio Grande. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.1, p.90-93, 2010.

Mendes-de-Almeida, F., Labarthe, N., Guerrero, J., Faria, M.C.F., Branco, A.S., Pereira, C.D., Barreira, J.D., Pereira, M.J.S. Follow-up of the health conditions of an urban colony of free-roaming cats (*Felis catus* Linnaeus, 1758) in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.147, n.1-2, p.9-15, 2007.

Miceli, N.G., Gavioli, F.A., Gonçalves, L.R., André, M.R., Sousa, V.R.F., Sousa, K.C.M., Machado, R.Z. Molecular detection of feline arthropod-borne pathogens in cats in Cuiabá, state of Mato Grosso, central-western region of Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.22, n.3, p.385-390, 2013.

Museux, K., Boretti, F.S., Willi, B., Riond, B., Hoelzle, K., Hoelzle, L.E., Wittenbrink, M.M., Tasker, S., Wengi, N., Reusch, C.E., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R. In vivo transmission studies of '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' in the domestic cat. **Veterinary Research**, v.40, n.5, p.40-45, 2009.

Nibblett, B.M.D., Snead, E.C., Waldner, C., Taylor, S.M., Jackson, M.L., Knorr, L.M. Anemia in cats with hemotropic mycoplasma infection: Retrospective evaluation of 23 cases (1996-2005). **The Canadian Veterinary Journal**, v.50, p.1181-1185, 2009.

Oliveira, L.S. **Investigação molecular de *Ehrlichia* em uma população de cães e gatos em Viçosa/MG**. Viçosa, 2008. 75f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa.

Peixoto, P.V., Soares, C.O., Scofield, A., Santiago, C.D., França, T.N., Barros, S. Fatal cytauxzoonosis in captive-reared lions in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.145, p.383-387, 2007.

Roura, X., Peters, I.R., Altet, L., Tabar, M.D., Barker, E.N., Planellas, M., Helps, C.R., Francino, O., Shaw, S.E., Tasker, S. Prevalence of hemotropic mycoplasmas in healthy and unhealthy cats and dogs in Spain. **Journal of Veterinary Diagnostic**, v.22, n.2, p.270-274, 2010.

Santos, A. P. **Infecção por hemoplasmas em felinos domésticos da região de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil**. Porto Alegre, 2008. 162f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Santos, D.L. **Prevalência de imunodeficiência felina viral, leucemia viral e peritonite infecciosa em felinos domésticos atendidos no hospital veterinário da Universidade Anhembi Morumbi da capital de São Paulo**. São Paulo, 2012. 23f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Paulista.

Silva, F.R.C. **Prevalência das infecções pelos vírus da leucemia viral felina e da imunodeficiência viral felina na cidade de Porto Alegre**. Porto Alegre, 2007. 57f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Souza, H.J.M. Teixeira, C.H.R., Graça, R.F.S. Estudo epidemiológico de infecções pelo vírus da leucemia e/ou imunodeficiência felina, em gatos domésticos do município do Rio de Janeiro. **Clínica Veterinária**, v.36, p.14-21, 2002.

Souza, H.J.M., Teixeira, C.H.R.T. Leucemia Viral Felina. In: **Coletâneas em Medicina e Cirurgia Felina**. 1.ed. LF-Livros, 2003. Cap.22. p.251-267.

Souza, A.M. **Frequência de infecção por *Bartonella spp.* e alterações sanguíneas em gatos domésticos no Rio de Janeiro - Brasil**. 2009. 97f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Fluminense.

Souza, A.M., Almeida, D.N.P., Guterres, A., Gomes, R., Favacho, A.R.M., Moreira, N.S., Maia, L.M.P., Rozental, T., Filho, R.A.T., Cerqueira, A.M.F., Lemos, E.R.F., Almosny, N.R.P.

Bartonelose: análise molecular e sorológica em gatos do Rio de Janeiro – Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.17, n.1, p.7-11, 2010.

Staggemeier, R., Venker, C.A., Klein, D.H., Petry, M., Spilki, F.R., Cantarelli, V.V. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats in the south of Brazil: a molecular study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, n.7, p.873-878, 2010.

Sykes, J.E. Feline hemotropic mycoplasmosis (feline hemobartonellosis). **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.33, n.4, p.773-789, 2003.

Sykes, J.E., Terry, J.C., Lindsay, L.L., Owens, S.D. Prevalences of various hemoplasmas species among cats in the United States with possible hemoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.232, n.3, p.372-379, 2008.

Tasker, S., Binns, S.H., Day, M.J., Gruffydd-Jones, T.J., Harbour, D.A., Helps, C.R., Jensen, W.A., Olver, C.S., Lappin, M.R. Use of a PCR assay to assess the prevalence and risk factors for *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' in cats in the United Kingdom. **Veterinary Record**. v.152, p.193–198, 2003.

Teixeira, B.M., Rajão, D.S., Haddad, J.P.A., Leite, R.C., Reis, J.K.P. Ocorrência do vírus da imunodeficiência felina e do vírus da leucemia felina em gatos domésticos mantidos em abrigos no município de Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.4, p.939-942, 2007.

Willi, B., Boretti, F.S., Tasker, S., Meli, M.L., Wngi, N., Reusch, C.E., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R. From *Haemobartonella* to hemoplasma: Molecular methods provide new insights. **Veterinary Microbiology**, v.125, p.197-209, 2007.

Weiss, D.J., Wardrop, K.J. **Veterinary Hematology**. 6.ed. Wiley-Blackwell, 2010. 1232p.

Leutenegger, C.M., Klein, D., Hofmann-Lehmann, R., Mislin, C., Hummel, U., Böni, J., Boretti, F., Guenzburg, W.H., Lutz, H. Rapid FIV provirus quantification by PCR using the TaqMan® fluorogenic real time detection system. **Journal of Virological Methods**, v.78, p.105-116, 1999.

Foley, J.E., Leutenegger, C.M., Stephen Dumler, J., Pedersen, N.C., Madigan, J.E. Evidence for modulated immune response to *Anaplasma phagocytophila* sensu lato in cats with FIV-induced immunosuppression. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.26, n.2, p.103-113, 2003.

Pusterla, N., Huder, J.B., Leutenegger, C.M., Braun, U., Madigan, J.E., Lutz, H. Quantitative real-time PCR for detection of members of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup in host animals and Ixodes ricinus ticks. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.1329-1331, 1999.

Sykes, J.E., Drazenovich, N.L., Kyles, A.E., Ball, L.M., Leutenegger, C.M. Detection of mixed infections with "Candidatus Mycoplasma haemominutum" and *Mycoplasma haemofelis* using real-time TaqMan polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.19, n.3, p.250-255, 2007.

3. FATORES DE RISCO PARA INFECÇÕES E COINFECÇÕES POR HEMOPARASITAS E RETROVÍRUS EM GATOS DOMÉSTICOS

3.1 RESUMO

As infecções pelos retrovírus FIV (vírus da imunodeficiência felina) e FeLV (vírus da leucemia felina) são responsáveis por alta morbidade e mortalidade em gatos domésticos no mundo todo. Os hemoparasitas comumente são agentes oportunistas em uma infecção retroviral, devido à imunodeficiência causada pelo vírus, podendo agravar o quadro clínico do paciente. Os principais fatores de risco para infecção por retrovírus já foram estabelecidos, no entanto, o papel de artrópodes sugadores de sangue e o contato entre gatos na disseminação desses agentes é desconhecida. Os fatores de risco relacionados à infecção pelos hemoparasitas não estão completamente elucidados. O objetivo deste estudo foi determinar os fatores de risco envolvidos em infecções e coinfeções de gatos domésticos por hemoparasitas e retrovírus a fim de estabelecer medidas de prevenção. Foram avaliadas 142 amostras de sangue de gatos domésticos e aplicados questionários para todos os responsáveis pelos animais. As questões avaliaram os seguintes fatores de risco: idade, sexo, histórico de infecção por pulgas ou carrapatos, de outras doenças, acesso à rua, contato com outros gatos, mordidas de outros gatos e de transfusão sanguínea. Realizou-se um painel de detecção de patógenos pela técnica do PCR em tempo real para os seguintes agentes: *Anaplasma spp.*, *Bartonella spp.*, *Cytauxzoon felis*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma haemofelis*, ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’, ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’, FIV e FeLV; e sorologia para detecção de anticorpos contra FIV e antígeno (proteína nuclear p27) da FeLV. Gatos machos, na faixa etária entre um e oito anos, e com acesso à rua são mais predispostos a infecções pelos hemoparasitas *Bartonella spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma haemofelis*, ‘*Candidatus M. haemominutum*’, ‘*Candidatus M. turicensis*’, e pelos retrovírus FIV e FeLV. Todos os gatos positivos para hemoplasmas e *Bartonella spp.* tinham histórico de pulgas e contato com outros gatos. Esses vetores artrópodes são provavelmente as principais formas de transmissão natural desses hemoparasitas entre gatos. As prevalências de mordidas por outros gatos encontradas nas infecções por hemoplasmas, *Bartonella spp.* e FeLV, indicam que esse fator de risco deve ser considerado em infecções por estes agentes. Apenas um gato infectado por *Ehrlichia spp.* possuía histórico de contato com carrapatos, indicando que outras formas de transmissão deste agente podem estar envolvidas, além de picadas por carrapatos.

Palavras-chave: gatos, fatores de risco, retrovírus, hemoparasitas

3.2 ABSTRACT

Infections by retroviruses FIV (feline immunodeficiency virus) and FeLV (feline leukemia virus) are responsible for high morbidity and mortality in domestic cats worldwide. Hemoparasites commonly are opportunistic agents in a retroviral infection due to immunodeficiency caused by the virus, and may worsen the patient's condition. The main risk factors for infection by retroviruses have been established, however, the role of blood -sucking arthropods and contact between cats in the spread of these agents is unknown. Risk factors related to infection by hemoparasites are not fully elucidated. The aim of this study was to investigate the risk factors involved in infections and co-infections of domestic cats by hemoparasites and retroviruses to establish preventive measures. One hundred and forty two blood samples from domestic cats and questionnaires applied to the guardians of the animals were evaluated. The questions assessed the following risk factors: age, sex, history of infection by fleas or ticks, other diseases, street access, contact with other cats, bites from other cats and blood transfusion. A real time PCR panel was performed for the following agents: *Anaplasma spp.*, *Bartonella spp.*, *Cytauxzoon felis*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma haemofelis*, 'Candidatus Mycoplasma haemominutum', 'Candidatus Mycoplasma turicensis', FIV and FeLV, and by serology for detection of FIV antibodies and FeLV antigen (p27 core protein). Male cats aged between one and eight years, with access to the street, are more susceptible to infection with the following hemoparasites: *Bartonella spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma haemofelis*, 'Candidatus M. haemominutum', 'Candidatus Mycoplasma turicensis', and by retroviruses FIV and FeLV. All positive cats to hemoplasma and *Bartonella spp.* had fleas and a history of contact with other cats. These arthropod vectors are probably the main natural transmission of these hemoparasites between cats. The prevalence of bites by other cats found in *Bartonella spp.* and FeLV infections, indicate that this risk factor should be considered in infections by these agents. Only one cat infected with *Ehrlichia spp.* had a history of contact with ticks, indicating that other forms of transmission of this agent may be involved in addition to tick bites.

Key word: cats, risk factors, retrovirus, hemoparasites

3.3 INTRODUÇÃO

As infecções pelos retrovírus FIV (vírus da imunodeficiência felina) e FeLV (vírus da leucemia felina) são responsáveis por alta morbidade e mortalidade em gatos domésticos no mundo todo (Hartmann et al., 2001; Levy, 2004; Jarrett, 2006; Greggs et al., 2011). Esses vírus causam imunodepressão e predispõe a ocorrência de neoplasias e uma série de doenças imunomediadas (Levy, 2004; Hartmann, 2012). Atualmente não há tratamento eficaz para eliminar a infecção viral (Jarret, 2006; Souza & Teixeira, 2003).

Os hemoparasitas comumente são agentes oportunistas em uma infecção retroviral, devido à imunodeficiência causada pelo vírus, podendo agravar o quadro clínico do paciente (Harrus et al, 2002; Luria et al., 2004; Harvey, 2006; Museux et al., 2009; Biondo et al., 2009). Os hemoparasitas mais relatados em gatos domésticos são os hemoplasmas, que são o *Mycoplasma haemofelis*, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' e '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' (Sykes et al., 2007). Contudo, outros hemoparasitas como *Ehrlichia spp.*, *Anaplasma spp.*, *Bartonella spp.* e *Cytauxzoon felis* podem estar envolvidos e devem ser pesquisados (Oliveira, 2008; Correa et al., 2011; Braga et al., 2013; Maia et al., 2013; Miceli et al., 2013).

Os principais fatores de risco para infecção por retrovírus já foram estabelecidos (Levy, 2004; Jarret, 2006; Greggs et al., 2011; Costa & Norsworthy, 2011). No entanto, o papel de artrópodes sugadores de sangue na disseminação desses agentes é desconhecida (Teixeira & Souza, 2003); e o contato entre gatos como fator de risco para infecção por FIV não está bem elucidado (Harbour et al., 2006; Grace, 2011).

A transmissão dos retrovírus ocorre principalmente por contato via saliva e secreções nasais, assim como pelo coito e via vertical em gatos infectados pelo FeLV (Hartmann et al., 2001; Levy, 2004; Jarrett, 2006); e por mordeduras em gatos infectados pelo FIV (Teixeira & Souza, 2003; Grace, 2011).

Os fatores de risco relacionados às infecções por hemoparasitas e às coinfeções com retrovírus não estão completamente esclarecidos (Macieira et al., 2008; Tasker, 2010). Possivelmente os vetores artrópodes são os principais transmissores dos hemoparasitas. Para os hemoplasmas e a *Bartonella spp.*, a pulga *Ctenocephalides felis* parece ter papel importante na transmissão desses agentes, mas sem comprovação científica (Robson & Crystal, 2011a). No caso da *Bartonella spp.*, a transmissão parece ocorrer via contato com as fezes da pulga, e no caso dos hemoplasmas, por picadas (Willi et al., 2007a; Grace & Norsworthy, 2011; Robson & Crystal, 2011a).

O DNA de hemoplasmas já foi encontrado em saliva e fezes de gatos, no entanto a transmissão direta entre gatos ainda não está bem elucidada (Nibblett et al., 2009).

Possivelmente não há predisposição de raça ou sexo para a hemoplasmosse, entretanto, alguns estudos apontam machos sendo mais afetados (Willi et al., 2006b; Sykes et al., 2008). As fêmeas podem transmitir para os seus filhotes recém-nascidos, mas o mecanismo de transmissão ainda não foi bem determinado (Sykes et al., 2003; Willi et al., 2007a; Coelho et al., 2011; Grace & Norsworthy, 2011). A transmissão iatrogênica por transfusão de sangue também deve ser considerada (Gary et al., 2006).

No caso dos hemoparasitas *Ehrlichia spp.*, *Anaplasma spp.* e *Cytauxzoon felis*, há uma forte correlação com carrapatos como vetores. O *Anaplasma phagocytophilum* é transmitido pelas formas de ninfa e adulto de *Ixodes scapularis* e *Ixodes pacificus*, e o *Cytauxzoon felis* pelo *Dermacentor variabilis* e *Amblyomma americanum*, sendo cientificamente comprovado (Meinkoth, 2004; Robson & Crystal, 2011b). A ingestão de roedores e a transfusão de sangue também parecem ser formas de contaminação para esses três hemoparasitas (Amosny & Massard, 2003; Stubbs, 2004; Correa et al., 2011; Grace, 2011).

Segundo Correa et al. (2011), um mesmo vetor pode albergar diversos agentes e, por sua vez diferentes espécies de vetores podem infectar o mesmo animal, sendo responsável por infecções de diferentes agentes patogênicos no mesmo hospedeiro, resultando em coinfeções que dificultam o diagnóstico e tratamento da doença.

O objetivo deste estudo foi estabelecer os fatores de risco envolvidos em infecções e coinfeções por hemoparasitas e retrovírus a fim de estabelecer medidas de prevenção.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Animais

Neste estudo foram avaliadas 142 amostras de sangue de gatos. Os gatos foram atendidos na rotina clínica particular de Curitiba/PR e o critério de seleção foi a idade, a qual deveria ser acima de seis meses. Este critério deve-se à possibilidade de resultados falso-positivos para FIV pela técnica de ELISA, a qual detecta anticorpos contra o vírus, e nesta faixa etária é possível ocorrer positividade em filhotes nascidos de gatas infectadas por FIV devido à presença de anticorpos maternos circulantes MDA (*maternally derived antibody*) (Harbour et al., 2006).

Do total de gatos avaliados, 81 eram machos e 61 fêmeas. Com relação à faixa etária, 20 tinham entre seis meses e um ano de idade, 86 entre um e oito anos, e 36 acima de oito anos. Todos os gatos eram sem raça definida e portanto este fator de risco não foi analisado estatisticamente.

3.4.2 Amostras

As amostras de sangue foram coletadas por venopunção da jugular, de forma asséptica (utilização de material descartável). Foi coletado um total de 5ml de sangue de cada gato, e armazenados 2ml em tubo com anticoagulante EDTA, e 3ml em tubo sem EDTA. As amostras com anticoagulante foram utilizadas para realização do hemograma e do PCR em tempo real, e as amostras sem anticoagulante foram centrifugadas por 5 minutos à 5000 rpm e o soro separado para as provas bioquímicas e sorológicas. Este material foi acondicionado em caixas de isopor sob refrigeração e encaminhado para a IDEXX Laboratories, Inc., em Sacramento/CA, Estados Unidos, para as análises por PCR em tempo real e ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*).

3.4.2 Questionário

Todos os responsáveis pelos gatos responderam a questionários afim de avaliar os fatores de risco envolvidos. As questões avaliadas estão apresentadas no quadro 1.

Quadro 1. Questionário de avaliação dos fatores de risco em infecções e coinfeções pelos hemoparasitas: *Anaplasma spp.*, *Bartonella spp.*, *Cytauxzoon felis*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma haemofelis*, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', '*Candidatus Mycoplasma turicensis*', e retrovírus FIV e FeLV em gatos domésticos de Curitiba/PR, Brasil.

QUESTIONARIO PARA AVALIAÇÃO DOS FATORES DE RISCO PARA INFECÇÕES E COINFEÇÕES POR HEMOPARASITAS E RETROVIRUS EM GATOS DOMESTICOS	
NOME DO ANIMAL: _____ RAÇA: _____ SEXO: _____ IDADE: _____	
PROPRIETARIO: _____ E-MAIL: _____ DATA: ____/____/____	
1- JA TEVE PULGAS ALGUMA VEZ?	9- FEZ TRANSFUSAO SANGUINEA ALGUMA VEZ?
SIM () NAO ()	SIM () NAO ()
2- JA TEVE CARRAPATOS ALGUMA VEZ?	10- FOI DIAGNOSTICADO COM ALGUMA DOENÇA NO PASSADO OU RECENTEMENTE?
SIM () NAO ()	SIM ()* NAO ()
4- JA FOI MORDIDO POR ALGUM GATO?	*QUAL: _____
SIM () NAO ()	_____
5- JA TEVE CONTATO COM OUTROS GATOS?	_____
SIM () NAO ()	
8- JA TEVE ACESSO A RUA?	
SIM () NAO ()	

O histórico de outras doenças envolveu a presença de doenças do trato urinário, gastrointestinal e respiratório, doenças periodontais, oftalmológicas, neurológicas, dermatológicas, auto-imunes, infecciosas (ex. PIF), ortopédicas e neoplasias.

3.4.3 PCR em tempo real e ELISA

Realizou-se um painel de detecção de patógenos pela técnica do PCR em tempo real para os seguintes agentes: *Anaplasma spp.*, *Bartonella spp.*, *Cytauxzoon felis*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma haemofelis*, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', '*Candidatus Mycoplasma turicensis*', vírus da imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV); e pelo método de ELISA (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*) para detecção de anticorpos contra FIV e antígeno (proteína nuclear p27) da FeLV. A técnica de ELISA foi realizada em um *kit* comercial (*Snap combo felino* - IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, EUA).

A técnica de PCR em tempo real foi validada analítica e clinicamente, e baseada na plataforma de serviços de propriedade da IDEXX RealPCR™ (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA). A extração de ácidos nucleicos foi realizada de acordo com o *kit* comercial *Corbett XTractor-Gene* (Qiagen, Valencia, CA, EUA). O gene *housekeeping* (18S rRNA) foi usado para determinar a quantidade de DNA e cDNA após a transcrição reversa e para confirmar a integridade do DNA. Regiões de nucleotídeos conservadas foram selecionadas e dois *primers*, bem como uma sonda de hidrólise foram designados para a hibridização desses nucleotídeos, usando um *software* comercial (*PrimerExpress Version 3.0*, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Além disso, dois *primers* juntos ao fragmento amplificado na técnica de PCR em tempo real foram designados para verificar as sequências. O PCR em tempo real foi realizado com um *primer* padrão e concentrações de sonda usando um *mastermix* disponível comercialmente (LC480 *ProbesMaster*, Roche Applied Science, Indianapolis, IN, EUA) na plataforma de PCR (Roche LightCycler 480). A IDEXX Laboratories não fornece informações a respeito dos *primers* e sondas por razões de segredo de comércio. A fim de reproduzir os resultados desse estudo, os testes podem ser adquiridos por esta empresa mencionando os nomes dos testes conforme descrito neste artigo.

3.4.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo teste do Qui-quadrado (para $n > 20$) ou Exato de Fisher (para $n \leq 20$). Foi utilizado o programa BioEstat 5.3, considerando o nível de significância de 95% ($P < 0,05$).

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes à prevalência de infecções e coinfeções e fatores de risco dos hemoparasitas: *Bartonella spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma haemofelis*, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', '*Candidatus Mycoplasma turicensis*'; e dos retrovírus FIV e FeLV em gatos domésticos estão apresentados nos tópicos a seguir. Neste estudo não foram detectados os agentes *Anaplasma spp.* e *Cytauxzoon felis*, não sendo avaliados os fatores de risco associados a eles.

3.5.1 Prevalência de infecções e coinfeções

Do total de amostras, 41,5% (59/142) foram positivas para pelo menos um agente etiológico, sendo que 26,8% (38/142) apresentaram infecção única e 14,8% (21/142) coinfeção. As prevalências de infecção única por retrovírus e por hemoparasita, assim como suas associações estão descritas na tabela 1. A prevalência de cada agente está descrita na tabela 2.

Tabela 1. Prevalência de infecções e coinfeções dos hemoparasitas: *Bartonella spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma haemofelis*, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', '*Candidatus Mycoplasma turicensis*', detectados por PCR em tempo real; e dos retrovírus FIV e FeLV, detectados por PCR em tempo real e/ou ELISA, em gatos domésticos (n=142) de Curitiba/PR, Brasil.

Infecção	Prevalência % (n=142)
Positivos	41,5% (59/142)
Infecção Única	26,8% (38/142)
Retrovírus	19,7% (28/142)
Hemoparasita	7% (10/142)
Coinfecção	14,8% (21/142)
Retrovírus e Hemoparasita	9,9% (14/142)
Retrovírus e Retrovírus	2,1% (3/142)
Hemoparasita e Hemoparasita	2,8% (4/142)

Tabela 2. Prevalência de infecções por hemoparasitas, detectados por PCR em tempo real, e retrovírus, detectados por PCR em tempo real e/ou ELISA, em gatos domésticos de Curitiba/PR, Brasil.

Patógeno	Prevalência % (n=142)
<i>Anaplasma spp.</i>	0% (0/142)
<i>Bartonella spp.</i>	2,8% (4/142)
<i>Cytauxzoon felis</i>	0% (0/142)
<i>Ehrlichia spp.</i>	1,4% (2/142)
<i>M. haemofelis</i>	4,9% (7/142)
' <i>Candidatus M. haemominutum</i> '	13,4% (19/142)
' <i>Candidatus M. turicensis</i> '	5,6% (8/142)
FIV	5,6% (8/142)

3.5.2 Prevalência de fatores de risco para hemoparasitas e retrovírus

Em relação aos hemoplasmas, o histórico de pulgas estava presente em todos os gatos infectados por *M. haemofelis* e por '*Candidatus M. turicensis*'. Do total de gatos infectados por '*Candidatus M. haemominutum*', 87,5% (14/16) tinham histórico de pulgas (Tabela 3). Os artrópodes sugadores de sangue são provavelmente as principais formas de transmissão natural desses hemoparasitas entre gatos. O DNA de '*Candidatus M. haemominutum*' e de *M. haemofelis* já foram detectados em pulgas *Ctenocephalides felis* coletadas de gatos e em fezes de pulgas (Willi et al., 2007a). Entretanto, tentativas experimentais de infecção de *M. haemofelis* e '*Candidatus M. haemominutum*' entre gatos via atividade hematófaga de *C. felis* não foi conclusiva (Woods et al., 2005).

O histórico de carrapatos foi observado em 14,3% (1/7) dos gatos infectado por *M. haemofelis*, 15,8% (3/19) dos infectados por '*Candidatus M. haemominutum*', e 50% (4/8) dos infectados por '*Candidatus M. turicensis*' (Tabela 3). Neste estudo não foram relatadas as espécies de carrapatos. Segundo Macieira et al. (2009), o DNA de hemoplasmas já foi identificado no gênero *Ixodes* e na espécie *Rhipicephalus sanguineus* e, portanto, é possível que os carrapatos estejam envolvidos na transmissão desses parasitas. Segundo Willi et al. (2007a) o carrapato *Ixodes sp.* pode apresentar uma variabilidade na capacidade de reservatório de hemoplasmas em gatos. No entanto, Braga et al. (2012) afirmam que os gatos parecem ser menos predispostos às infestações por carrapatos e aos parasitas transmitidos por esses artrópodes do que os cães, devido ao hábito de auto-higiene dos gatos.

O histórico de contato com outros gatos estava presente em todos os gatos infectados por hemoplasmas (Tabela 3). Histórico de mordidas por outros gatos foi observado em 28,6% (2/7) dos infectados por *M. haemofelis*, 42,1% (87/19) dos infectados por '*Candidatus M. haemominutum*' e em 62,5% dos infectados por '*Candidatus M. turicensis*' (Tabela 1). Estudos realizados em gatos infectados experimentalmente com '*Candidatus M. turicensis*', demonstraram a presença de DNA do hemoplasma nas fezes e saliva dos gatos até nove semanas após a infecção (Willi et al., 2007b). Outro estudo feito por Dean et al. (2005) detectaram '*Candidatus M. haemominutum*' em saliva de gatos infectados experimentalmente. Contudo, o contato entre gatos e mordidas entre eles ainda não foram comprovados em infecções naturais.

O acesso à rua estava presente em todos os gatos infectados pelo *Mycoplasma haemofelis*, todos os infectados por '*Candidatus M. turicensis*', e em 94,7% (18/19) dos

infectados por '*Candidatus M. haemominutum*' (Tabela 3). Este fator de risco deve ser considerado para as hemoparasitoses, pois aqueles de vida livre são mais expostos a vetores artrópodes (Meinkoth, 2004; Shaw et al., 2005; Grace, 2011; Robson & Crystal, 2011b).

Todos os gatos positivos para *Bartonella spp.* tiveram contato com pulgas e contato com outros gatos (Tabela 3). As pulgas *C. felis* são os principais vetores de *Bartonella spp.* entre os gatos. Estes artrópodes podem eliminar a bactéria viável nas fezes, após estarem infectados (Robson & Crystal, 2011a). O histórico de mordidas por outros gatos estava presente em 25% (1/4) dos infectados. A transmissão entre gatos foi estudada por Souza (2009), no entanto o autor observou que não houve infecção em animais livres do patógeno que coabitavam com gatos infectados em ambientes sem pulgas. Este dado indica que a transmissão deste parasita entre gatos possivelmente não ocorre através de arranhaduras, mordeduras, compartilhamento de comedouros e caixas de areia para dejetos.

Os dois gatos infectados por *Ehrlichia spp.* tinham histórico de pulgas, acesso à rua e contato com gatos (Tabela 3). Apenas um gato possuía histórico de contato com carrapatos, indicando que outras formas de transmissão deste agente podem estar envolvidas, além de picadas por carrapatos.

Com relação aos retrovírus, todos os gatos infectados por FIV e 80,5% (33/41) dos infectados por FeLV tinham histórico de acesso à rua (Tabela 3), confirmando que as taxas mais altas de infecção por esses vírus têm sido encontradas em gatos com livre acesso às ruas (Souza & Teixeira, 2003; Teixeira et al., 2007; Meinerz et al., 2010). Quase todos os infectados por estes retrovírus possuíam histórico de contato com outros gatos, e metade dos animais infectados por FIV haviam sido mordidos por outros gatos (Tabela 3). Segundo Grace (2011), as mordidas são a principal forma de transmissão de FIV, porém, há evidências de que a transmissão pode ocorrer casualmente entre gatos que vivem próximos por um período prolongado. O mesmo autor afirma que as fêmeas podem transmitir para a sua prole durante a gestação ou após, via colostro ou saliva, mas a ocorrência é infrequente em condições naturais. Dos gatos infectados por FeLV, 24,4% (10/41) haviam sido mordidos por outros gatos e, segundo Costa & Norsworthy (2011) essa forma de transmissão também deve ser considerada para este retrovírus.

Contato com pulgas foi observado nos gatos infectados unicamente pelos retrovírus (Tabela 4). No entanto, prevalências de acesso à rua e contato com outros gatos foram observadas de forma semelhante para estes agentes, podendo os fatores de risco estarem associados entre si e não diretamente com a taxa de infecção.

O histórico de outras doenças foi observado em maior proporção naqueles infectados apenas com retrovírus, do que nos infectados apenas com hemoparasitas (Tabela 4). Este fato pode ser explicado devido à patogenia dos retrovírus estar associada à imunodepressão, o que predispõe o desenvolvimento de outras doenças, enquanto que os hemoparasitas estão mais associados com a ocorrência de anemia (Souza & Teixeira, 2003; Grace, 2011).

Gatos infectados por '*Candidatus M. haemominutum*' e por FeLV já haviam passado pelo procedimento de transfusão sanguínea (Tabela 3). A transmissão iatrogênica via transfusão sanguínea por este hemoparasita foi relatada por Willi et al. (2006a). Este mesmo fator de risco foi observado em baixa prevalência para as coinfeções, sendo detectada apenas em um gato coinfectado com retrovírus e hemoparasita.

O fator de risco acesso à rua apresentou diferença estatística entre os gatos positivos (para qualquer agente) e os gatos negativos (Tabela 4). Neste estudo não foi observada diferença estatística para os fatores de risco avaliados entre gatos infectados unicamente por retrovírus e por hemoparasitas, e nem entre os coinfectados (Tabela 4). Este fato provavelmente se deve às características de histórico muito semelhantes na população avaliada como um todo.

Tabela 3. Prevalência de fatores de risco em infecções por hemoparasitas, detectados por PCR em tempo real, e retrovírus, detectados por PCR em tempo real e/ou ELISA, em gatos domésticos de Curitiba/PR, Brasil.

Patógeno (n)	Contato com pulgas	Contato com carrapatos	Contato com outros gatos	Mordidas por outros gatos	Acesso à rua	Transfusão sanguínea	Outras doenças
Prevalência %							
<i>Bartonella spp.</i> (4)	100% (4/4)	0% (0/4)	100% (4/4)	25% (1/4)	75% (3/4)	0% (0/4)	50% (2/4)
<i>Ehrlichia spp.</i> (2)	100% (2/2)	50% (1/2)	100% (2/2)	0% (0/2)	100% (2/2)	0% (0/2)	50% (1/2)
<i>M. haemofelis</i> (7)	100% (7/7)	14,3% (1/7)	100% (7/7)	28,6% (2/7)	100% (7/7)	0% (0/7)	28,6% (2/7)
<i>Candidatus M. haemominutum</i> ' (19)	89,5% (17/19)	15,8% (3/19)	100% (19/19)	42,1% (8/19)	94,7% (18/19)	42,1% (8/19)	52,6% (10/19)
' <i>Candidatus M. turicensis</i> ' (8)	100% (8/8)	50% (4/8)	100% (8/8)	62,5% (5/8)	100% (8/8)	0% (0/8)	50% (4/8)
FIV (8)	100% (8/8)	12,5% (1/8)	100% (8/8)	37,5% (3/8)	100% (8/8)	0% (0/8)	75% (6/8)
FeLV (41)	87,8% (36/41)	12,2% (5/41)	98% (40/41)	24,4% (10/41)	80,5% (33/41)	4,9% (2/41)	58,5% (24/41)

Tabela 4. Prevalência de fatores de risco em infecções únicas e coinfeções entre os hemoparasitas: *Bartonella spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma haemofelis*, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', '*Candidatus Mycoplasma turicensis*', detectados por PCR em tempo real; e retrovírus FIV e FeLV, detectados por PCR em tempo real e/ou ELISA, em gatos domésticos (n=142) de Curitiba/PR, Brasil.

Infecção (n)	Contato com pulgas	Contato com carrapatos	Contato com outros gatos	Mordidas por outros gatos	Acesso à rua	Transfusão sanguínea	Outras doenças
Prevalência %							
Negativo (83)	81,9% (68/83)	6% (5/83)	90,4% (75/83)	20,5% (17/83)	59% (49/83)	0% (0/83)	59% (49/83)
Positivo (59)	91,5% (54/59)	11,9% (7/59)	98,3% (58/59)	27,1% (16/59)	86,4% (51/59)	3,4% (2/59)	52,5% (31/59)
Valor de P	0.1424	0.7658	0.0803	0.4214	0.00067*	0.1709	0.4940
Retrovírus (28)	89,3% (25/28)	10,7% (3/28)	96,4% (27/28)	21,4% (6/28)	78,6% (22/28)	3,6% (1/28)	57,1% (16/28)
Hemoparasita (10)	100% (10/10)	10% (1/10)	100% (10/10)	30% (3/10)	90% (9/10)	0% (0/10)	30% (3/10)
Valor de P	0.5519	1	1	0.6731	0.6731	1	0.2690
Coinfecção (21)	90,5% (19/21)	9,5% (2/21)	100% (21/21)	33,3% (7/21)	90,5% (19/21)	4,8% (1/21)	61,9% (13/21)
Retrovírus e Hemoparasita (14)	85,7% (12/14)	7,1% (1/14)	100% (14/14)	42,9% (6/14)	92,9% (13/14)	7,1% (1/14)	64,3% (9/14)
Retrovírus e Retrovírus (3)	100% (3/3)	0% (0/3)	100% (3/3)	0% (0/3)	66,7% (2/3)	0% (0/3)	66,7% (2/3)
Hemoparasita e Hemoparasita (4)	100% (4/4)	25% (1/4)	100% (4/4)	25% (1/4)	100% (4/4)	0% (0/4)	20% (2/4)
Valor de P	0.9999	0.5666	1	0.5304	0.2999	1	0.8229

* Diferença significativa entre os gatos positivos e negativos para qualquer agente, para o fator de risco acesso à rua (P<0,05)

3.5.3 Presença de infecções e coinfeções em relação ao sexo

A prevalência de machos positivos foi maior do que a de fêmeas em infecções por *Bartonella spp.*, *M. haemofelis* e '*Candidatus M. turicensis*', apresentando diferença significativa para estes agentes (Tabela 5). Os machos também apresentaram maior prevalência do que de fêmeas para a taxa de infecção geral (positividade para pelo menos um agente) (P=0,019) (Tabela 6).

Este fato já foi relatado por alguns autores com relação à infecção por hemoplasmas (Willi et al., 2006b; Willi et al., 2007a; Sykes et al., 2008; Santos, 2008; Tasker, 2010). Segundo Sykes et al., 2008, a associação entre o sexo masculino e a prevalência de hemoplasmas sugere que mordidas em brigas pode ser um fator de risco. Neste estudo, a prevalência de mordidas por outros gatos na presença de hemoplasmas variou entre 28,6% e 62,5% devendo, portanto, ser considerado esse fator de risco em infecções por estes agentes.

Em relação aos demais parasitas, há poucos dados associando taxa de infecção e sexo. Em estudo feito por Braga et al. (2013), que detectaram 8,6% de prevalência para *E. canis*, não foram observadas associações entre a presença de infecção nos gatos e suas respectivas idades e sexo.

No caso dos retrovírus, as taxas mais altas de infecção por FIV têm sido encontradas em gatos machos, os quais frequentemente apresentam comportamento agressivo (Teixeira et al., 2007; Grace, 2011). Segundo Levy (2004), a infecção por FeLV é ligeiramente mais comum em gatos machos do que fêmeas.

Tabela 5. Relação entre sexo e a presença de infecções por hemoparasitas, detectados por PCR em tempo real, e retrovírus, detectados por PCR em tempo real e/ou ELISA, em gatos domésticos de Curitiba/PR, Brasil.

Patógeno (n)	Macho	Fêmea	Valor de P
	Prevalência %		
<i>Bartonella</i> spp. (4)	100% (4/4)*	0% (0/4)	0,029
<i>Ehrlichia</i> spp. (2)	50% (1/2)	50% (1/2)	1
<i>M. haemofelis</i> (7)	85,7% (6/7)*	14,3% (1/7)	0,029
<i>Candidatus</i> <i>M. haemominutum</i> ' (19)	84,2% (16/19)*	15,8% (3/19)	<0,001
' <i>Candidatus</i> <i>M. turicensis</i> ' (8)	87,5% (7/8)*	12,5% (1/8)	0,041
FIV (8)	75% (6/8)	25% (2/8)	0,132
FeLV (41)	68,3% (28/41)	31,7% (13/41)	0,002

Tabela 6. Relação entre sexo e a presença de infecções e coinfeções pelos hemoparasitas: *Bartonella* spp., *Ehrlichia* spp., *Mycoplasma haemofelis*, '*Candidatus* *Mycoplasma haemominutum*', '*Candidatus* *Mycoplasma turicensis*', detectados por PCR em tempo real; e retrovírus FIV e FeLV, detectados por PCR em tempo real e/ou ELISA, em gatos domésticos de Curitiba/PR, Brasil.

Infecção (n)	Macho	Fêmea
	Prevalência %	
Negativo (83)	48,2% (40/83)	51,8% (43/83)
Positivo (59)	69,5% (41/59)*	30,5% (18/59)
Valor de P	0,019	
Infecção Única (38)		
Retrovírus (28)	60,5% (23/38)	39,5% (15/38)
Hemoparasita (10)	53,6% (15/28)	46,4% (13/28)
Valor de P	80% (8/10)	20% (2/10)
	0,259	
Coinfecção (21)		
Retrovírus e Hemoparasita (14)	85,7% (18/21)	14,3% (3/21)
Retrovírus e Retrovírus (3)	100% (14/14)	0% (0/14)
Hemoparasita e Hemoparasita (4)	66,7% (2/3)	33,3% (1/3)
Valor de P	50% (2/4)	50% (2/4)
	0,235	
		0,176

* Diferença significativa entre machos e fêmeas infectados (P<0,05)

3.5.4 Presença de infecções e coinfeções em relação à faixa etária

A maior prevalência observada em todos os agentes pesquisados foi para a faixa etária entre um e oito anos, apresentando diferença significativa para os agentes *Bartonella* spp. e

FeLV (Tabela 7). Para este retrovírus, gatos na faixa etária de um a cinco anos e que vivem em grupos com contato íntimo entre os animais são os mais susceptíveis à infecção (Souza & Teixeira, 2003; Teixeira et al., 2007).

As taxas mais altas de infecção por FIV têm sido encontradas em gatos adultos (Teixeira et al., 2007; Grace, 2011). Segundo Sykes et al. (2008) e Coelho et al. (2011), os gatos mais jovens são mais acometidos por hemoplasmas do que os idosos. Em relação aos demais parasitas, há poucos dados associando taxa de infecção e idade.

Não houve diferença estatística entre as infecções únicas e coinfeções para a faixa etária (Tabela 8).

Tabela 7. Relação entre idade e a presença de infecções por hemoparasitas, detectados por PCR em tempo real, e retrovírus, detectados por PCR em tempo real e/ou ELISA, em gatos domésticos de Curitiba/PR, Brasil.

Patógeno (n)	Idade	Idade	Idade	Valor de P
	6m – 1a	1a – 8a	> 8a	
	Prevalência %			
<i>Bartonella</i> spp. (4)	0% (0/4)	100% (4/4)*	0% (0/4)	0,029
<i>Ehrlichia</i> spp. (2)	0% (0/2)	50% (1/2)	50% (1/2)	1
<i>M. haemofelis</i> (7)	0% (0/7)	71,4% (5/7)	28,6% (2/7)	0,286
<i>Candidatus</i> <i>M. haemominutum</i> (19)	0% (0/19)	57,9% (11/19)	42,1% (8/19)	0,517
<i>'Candidatus</i> <i>M. turicensis</i> (8)	0% (0/8)	62,5% (5/8)	37,5% (3/8)	0,619
FIV (8)	0% (0/8)	75% (6/8)	25% (2/8)	0,132
FeLV (41)	14,6% (6/41)	68,3% (28/41)*	17% (7/41)	<0,001

* Diferença estatística entre os agentes para faixa etária de um a oito anos (P<0,05)

Tabela 8. Relação entre faixa etária e a presença de infecções e coinfeções pelos hemoparasitas: *Bartonella* spp., *Ehrlichia* spp., *Mycoplasma haemofelis*, '*Candidatus* *Mycoplasma haemominutum*', '*Candidatus* *Mycoplasma turicensis*', detectados por PCR em tempo real; e retrovírus FIV e FeLV, detectados por PCR em tempo real e/ou ELISA, em gatos domésticos de Curitiba/PR, Brasil.

Infecção (n)	Faixa etária 6m – 1a	Faixa etária 1a – 8a	Faixa etária > 8a
	Prevalência %		
Negativo (83)	19,3% (16/83)	54,2% (45/83)	26,5% (22/83)
Positivo (59)	8,5% (5/59)	69,5% (41/59)	22% (13/59)
Valor de P	0,122	0,097	0,680
Infecção Única (38)	13,2% (5/38)	68,4% (26/38)	18,4% (7/38)
Retrovírus (28)	17,9% (5/28)	67,9% (19/28)	14,3% (4/28)
Hemoparasita (10)	0% (0/10)	70% (7/10)	30% (3/10)
Valor de P	0,298	1	0,351
Coinfecção (21)	0% (0/21)	71,4% (15/21)	28,6% (6/21)
Retrovírus e Hemoparasita (14)	0% (0/14)	71,4% (10/14)	28,6% (4/14)
Retrovírus e Retrovírus (3)	0% (0/3)	100% (3/3)	0% (0/3)
Hemoparasita e Hemoparasita (4)	0% (0/4)	50% (2/4)	50% (2/4)
Valor de P	NA	0,567	0,569

3.6 CONCLUSÃO

Neste estudo, foi observado que gatos machos, na faixa etária entre um e oito anos, e com acesso à rua são mais predispostos à infecções pelos hemoparasitas *Bartonella spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma haemofelis*, 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*', 'Candidatus *Mycoplasma turicensis*', e pelos retrovírus FIV e FeLV. Não foi observada diferença significativa para os fatores de risco avaliados em gatos infectados unicamente por retrovírus e por hemoparasitas, e nem entre os coinfectados.

Todos os gatos positivos para hemoplasmas e *Bartonella spp.* tinham histórico de pulgas e contato com outros gatos. Esses vetores artrópodes são provavelmente as principais formas de transmissão natural desses hemoparasitas entre gatos. Todos os gatos infectados por FIV também possuíam histórico de contato com gatos, no entanto, há necessidade de mais estudos que comprovem este fator de risco para estes agente. O contato com pulgas em gatos infectados apenas com retrovírus também merece atenção para mais estudos.

As prevalências de mordidas por outros gatos encontradas nas infecções por hemoplasmas, *Bartonella spp.* e FeLV, indicam que esse fator de risco deve ser considerado em infecções por estes agentes. Apenas um gato infectado por *Ehrlichia spp.* possuía histórico de contato com carrapatos, indicando que outras formas de transmissão deste agente podem estar envolvidas, além de picadas por carrapatos.

REFERÊNCIAS

- Almosny, N.R.P., Massard, C.L. Erliquiose. In: Souza, H.J.M, **Coletâneas em Medicina e Cirurgia Felina**. 1.ed. LF-Livros, 2003. Cap. 16. p.199-201.
- Biondo, A.W., Santos, A.P., Guimarães, A.M.S., Vieira, R.F.C., Vidotto, O., Macieira, D.B., Almosny, N.R.P., Molento, M.B., Timenetsky, J., Morais, H.A., Gonzáles, F.H.D., Messik, J.B. A review of the occurrence of hemoplasmas (hemotrophic mycoplasmas) in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, n.3, p.1-7, 2009.
- Braga, M.S.C.O., André, M.R., Freschi, C.R., Teixeira, M.C.A., Machado, R.Z. Molecular and serological detection of *Ehrlichia spp.* in cats on São Luiz Island, Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.21, n.1, p.37-41, 2012.
- Braga, I.A., Santos, L.G.F., Melo, A.L.T., Jaune, F.W., Ziliani, T.F., Girardi, A.F., Aguiar, D.M. Hematological values associated to the serological and molecular suspected of *Ehrlichia canis* infection. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.22, n.4, p.470-474, 2013.
- Coelho, P.C.M.S., Angrimani, D.S.R., Marques, E.S. Micoplasmose em felinos domésticos: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano IX, n.16, 2011.

Correa, E.S., Paludo, G.R., Scaloni, M.C., Machado, J.A., Lima, A.C.Q., Pinto, A.T.B., Thiebaut, J.T.L., Albernaz, A.P. Investigação molecular de *Ehrlichia spp.* e *Anaplasma platys* em felinos domésticos: alterações clínicas, hematológicas, bioquímicas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.10, p.899-909, 2011.

Costa, F.V.A.; Norsworthy, G.D. Feline leukemia virus. In: Norsworthy, G.D., Grace, S.F., Crystal, M.A., Tilley, L.P. **The Feline Patient**. 4.ed. Wiley-Blackwell, 2011. Cap.77, p.184-186.

Dean, R., Helps, C.R., Gruffydd-Jones, T.J., Tasker, S. Use of real-time PCR to detect *M. haemofelis* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' in the saliva and salivary glands of haemoplasma-infected cats. In: **Proceedings of the BSAVA Congress, Gloucester, UK**, p.554, 2005.

Gary, A.T., Richmond, H.L., Tasker, S., Hackett, T.B., Lappin, M.R. Survival of *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' in blood of cats used for transfusions. **Journal of feline medicine and surgery**, v.8, n.5, p.321-326, 2006.

Grace, S.F. Feline Immunodeficiency virus infection. In: Norsworthy, G.D., Grace, S.F., Crystal, M.A., Tilley, L.P. **The Feline Patient**. 4.ed. Wiley-Blackwell, 2011. Cap.75, p.179-180.

Grace, S.F., Norsworthy, G.D. Hemoplasmosis. In: Norsworthy, G.D., Grace, S.F., Crystal, M.A., Tilley, L.P. **The Feline Patient**. 4.ed. Wiley-Blackwell, 2011. Cap.92, p.218-219.

Greggs, W.M., Clouser, C.L., Patterson, S.E., Mansky, L.M. Broadening the use of antiretroviral therapy: the case for feline leukemia virus. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v.7, p.115-122, 2011.

Harbour, D.A., Caney, S.M.A., Sparkes, A.H. Infecção pelo vírus da Imunodeficiência Felina. In: **Clínica e Terapêutica em Felinos**. 3.ed. Roca, 2006. Cap.24, p.495-506.

Harrus, S., Klement, E., Aroch, I., Stein, T., Bark, H., Lavy, E., Mazaki-Tovi, M., Baneth, G. Retrospective study of 46 cases of feline hemobartonellosis in Israel and their relationship with FeLV and FIV infections. **The Veterinary Record**, v.151, n.3, p.82-85, 2002.

Hartmann, K., Werner, R.M., Egberink, H., Jarrett, O. Comparison of six in-house tests for the rapid diagnosis of feline immunodeficiency and feline leukaemia virus infections. **The Veterinary Record**, v.149, n.11, p.317-320, 2001.

Hartmann, K. Clinical aspects of feline retroviruses: A review. **Viruses**, v.4, p.2684-2710, 2012.

Harvey, J.W. Hemotropic mycoplasmosis (hemobartonellosis). In: Greene, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 3.ed. Elsevier, 2006. Cap.31, p.252-260.

Jarrett, O., Hosie, M.J. Infecção pelo vírus da leucemia felina. In: Chandler, E.A., Gaskell, C.J., Gaskell, R.M. **Clínica e terapêutica em felinos**. Roca, 2006. Cap.23. p.487-494.

Levy J.K., 2004. VLF e doença não-neoplásica relacionada. In: Ettinger S.J. & Feldman E.C. **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. 5.ed. Guanabara Koogan, 2004. Cap.89, p.446-455.

Luria, B.J., Levy, J.K., Lappin, M.R., Breitschwerdt, E.B., Legendre, A.M., Hernandez, J.A., Gorman, S.P., Lee, I.T., Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.6, n.5, p.287-296, 2004.

Macieira, D. B., Menezes, R.C.A.A., Damico, C.B., Almosny, N.R.P., McLane, J.K.D., Messick, J.B. Prevalence and risk factors for hemoplasmas in domestic cats naturally infected with feline immunodeficiency virus and/or feline leukemia virus in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.10, n.2, p.120-129, 2008.

Macieira, D.B., Menezes, R.C.A.A., Damico, C.B., Almosny, N.R.P., Messik, J.B. Uso da técnica de Southern blot/Hibridização associada à reação em cadeia da polimerase para aumentar a sensibilidade no diagnóstico das infecções por hemoplasmas em gatos domésticos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, supl.1, p.1-6, 2009.

Maia, L.M.P., Cerqueira, A.M.F., Macieira, D.B., Souza, A.M., Moreira, N.S., Silva, A.V., Messick, J.B., Ferreira, R.F., Almosny, N.R.P. *Cytauxzoon felis* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' coinfection in a Brazilian domestic cat (*Felis catus*). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.22, n.2, 2013.

Meinerz, A.R.M. et al. Frequência do vírus da leucemia felina (VLF_e) em felinos domésticos (*Felis catus*) semidomiciliados nos municípios de Pelotas e Rio Grande. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.1, p.90-93, 2010.

Meinkoth, J.H. *Cytauxzoon felis*. In: Lappin, M.R. **Segredos em Medicina Interna de Felinos**. Artmed, 2004. Cap.75. p.460-463.

Miceli, N.G., Gavioli, F.A., Gonçalves, L.R., André, M.R., Sousa, V.R.F., Sousa, K.C.M., Machado, R.Z. Molecular detection of feline arthropod-borne pathogens in cats in Cuiabá, state of Mato Grosso, central-western region of Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.22, n.3, p.385-390, 2013.

Museux, K., Boretti, F.S., Willi, B., Riond, B., Hoelzle, K., Hoelzle, L.E., Wittenbrink, M.M., Tasker, S., Wengi, N., Reusch, C.E., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R. In vivo transmission studies of 'Candidatus Mycoplasma turicensis' in the domestic cat. **Veterinary Research**, v.40, n.5, p.40-45, 2009.

Nibblett, B.M.D., Snead, E.C., Waldner, C., Taylor, S.M., Jackson, M.L., Knorr, L.M. Anemia in cats with hemotropic mycoplasma infection: Retrospective evaluation of 23 cases (1996-2005). **The Canadian Veterinary Journal**, v.50, p.1181-1185, 2009.

Oliveira, L.S. **Investigação molecular de *Ehrlichia* em uma população de cães e gatos em Viçosa/MG**. Viçosa, 2008. 75f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa.

Robson, M., Crystal, M.A. Bartonellosis. In: Norsworthy, G.D., Grace, S.F., Crystal, M.A., Tilley, L.P. **The Feline Patient**. 4.ed. Wiley-Blackwell, 2011a. Cap.17, p.35-36.

Robson, M., Crystal, M.A. Cytauxzoonosis. In: Norsworthy, G.D., Grace, S.F., Crystal, M.A., Tilley, L.P. **The Feline Patient**. 4.ed. Wiley-Blackwell, 2011b. Cap.47, p.106-107.

Santos, A. P. **Infecção por hemoplasmas em felinos domésticos da região de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil**. Porto Alegre, 2008. 162 f. Dissertação (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Shaw, S.E., Binn, S.H., Birtles, R.J., Day, M.J., Smithson, R., Kenny, M.J. Molecular evidence of tick-transmitted infections in dogs and cats in the United Kingdom. **Veterinary Record**, v.157, n.21, p.645-648, 2005.

Souza, H.J.M, Teixeira, C.H.R.T. Leucemia Viral Felina. In: **Coletâneas em Medicina e Cirurgia Felina**. 1.ed. LF-Livros, 2003. Cap.22. p.251-267.

Souza, A.M. **Frequência de infecção por *Bartonella spp.* e alterações sanguíneas em gatos domésticos no Rio de Janeiro - Brasil**. 2009. 97f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Fluminense.

Stubbs, C.J. Erliquiose. In: Lappin, M.R. **Segredos em Medicina Interna de Felinos**. Artmed, 2004. Cap.78. p.476-479.

Sykes, J.E. Feline hemotropic mycoplasmosis (feline hemobartonellosis). **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.33, n.4, p.773-789, 2003.

Sykes, J.E, Drazenovich, N.L., Kyles, A.E., Ball, L.M., Leutenegger, C.M. Detection of mixed infections with ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ and *Mycoplasma haemofelis* using real-time TaqMan polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.19, n.3, p.250-255, 2007.

Sykes, J.E., Terry, J.C., Lindsay, L.L., Owens, S.D. Prevalences of various hemoplasmas species among cats in the United States with possible hemoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.232, n.3, p.372-379, 2008.

Tasker, S. Haemotropic mycoplasmas: what’s their real significance in cats? **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.12, n.5, p.369-381, 2010.

Teixeira, C.H.R., Souza, H.J.M. Manifestações clínicas associadas à infecção pelo vírus da imunodeficiência felina. In: **Coletâneas em Medicina e Cirurgia Felina**. 1.ed. LF-Livros, 2003. Cap.25. p.301-317.

Teixeira, B.M., Rajão, D.S., Haddad, J.P.A., Leite, R.C., Reis, J.K.P. Ocorrência do vírus da imunodeficiência felina e do vírus da leucemia felina em gatos domésticos mantidos em abrigos no município de Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.4, p.939-942, 2007.

Willi, B., Boretti, F.S., Baumgartner, C., Tasker, S., Wenger, B., Cattori, V., Meli, M.L., Reusch, C.E., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R. Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, p.961–969, 2006a.

Willi, B., Tasker, S., Boretti, F.S., Doherr, M.G., Cattori, V., Meli, M.L., Lobetti, R.G., Malik, R., Reusch, C.E., Lutz, H., Hoffmann-Lehmann, R. Phylogenetic analysis of ‘*Candidatus Mycoplasma turicensis*’ isolates from pet cats in the United Kingdom, Australia, and South

Africa, with analysis of risk factors for infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, p.4430-4435, 2006b.

Willi, B., Boretti, F.S., Tasker, S., Meli, M.L., Wngi, N., Reusch, C.E., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R. From *Haemobartonella* to hemoplasma: Molecular methods provide new insights. **Veterinary Microbiology**, v.125, p.197-209, 2007a.

Willi, B., Boretti, F.S., Meli, M.L., Bernasconi, M.V., Casati, S., Hegglin, D., Puorger, M., Neimark, H., Cattori, V., Wengi, N., Reusch, C.E., Lutz, H., Hofmann-Lehmann, R. Realtime PCR investigation of potential vectors, reservoirs and shedding patterns of feline hemotropic mycoplasmas. **Applied and Environmental Microbiology**. v.73, p.3798–3802, 2007b.

Woods, J.E., Brewer, M.M., Hawley, J.R., Wisnewski, N., Lappin, M.R., 2005. Evaluation of experimental transmission of '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' and *Mycoplasma haemofelis* by *Ctenocephalides felis* to cats. **American Journal of Veterinary Research**, v.66, p.1008–1012, 2005.

Leutenegger, C.M., Klein, D., Hofmann-Lehmann, R., Mislin, C., Hummel, U., Böni, J., Boretti, F., Guenzburg, W.H., Lutz, H. Rapid FIV provirus quantification by PCR using the TaqMan® fluorogenic real time detection system. **Journal of Virological Methods**, v.78, p.105-116, 1999.

Foley, J.E., Leutenegger, C.M., Stephen Dumler, J., Pedersen, N.C., Madigan, J.E. Evidence for modulated immune response to *Anaplasma phagocytophila* sensu lato in cats with FIV-induced immunosuppression. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.26, n.2, p.103-113, 2003.

Pusterla, N., Huder, J.B., Leutenegger, C.M., Braun, U., Madigan, J.E., Lutz, H. Quantitative real-time PCR for detection of members of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup in host animals and Ixodes ricinus ticks. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.1329-1331, 1999.

Sykes, J.E., Drazenovich, N.L., Kyles, A.E., Ball, L.M., Leutenegger, C.M. Detection of mixed infections with "*Candidatus Mycoplasma haemominutum*" and *Mycoplasma haemofelis* using real-time TaqMan polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.19, n.3, p.250-255, 2007.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, foram identificados os agentes '*Candidatus M. turicensis*', *Ehrlichia spp.* e *Bartonella spp.* em gatos domésticos pela primeira vez no Paraná. O agente mais prevalente em gatos anêmicos no presente estudo foi o FeLV e mais da metade dos gatos anêmicos infectados apenas por este agente apresentaram anemia arregenerativa. Quando em associação com hemoparasitas, anemia arregenerativa foi encontrada em mais de 80% dos infectados, sugerindo que a coinfeção entre retrovírus e hemoparasita tende a agravar o quadro clínico do paciente. A principal associação ocorreu com o hemoparasita '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*'.

Observou-se que gatos saudáveis podem ser portadores assintomáticos coinfectados por hemoparasitas ou retrovírus, exigindo monitoramento pois a reativação da infecção pode ocorrer e resultar em doença clínica. Gatos anêmicos apresentam alta prevalência de infecções, assim como de coinfeções, podendo apresentar associação de até cinco patógenos. Ainda, gatos anêmicos infectados ou coinfectados por hemoparasitas e retrovírus são mais propensos a ir a óbito do que gatos doentes não anêmicos.

Gatos machos, na faixa etária entre um e oito anos, e com acesso à rua são mais predispostos à infecções pelos hemoparasitas *Bartonella spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma haemofelis*, '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*', '*Candidatus Mycoplasma turicensis*', e pelos retrovírus FIV e FeLV. Não foi observada diferença significativa para os fatores de risco avaliados em gatos infectados unicamente por retrovírus e por hemoparasitas, e nem entre os coinfectados.

Mais estudos são necessários para comprovar alguns fatores de risco como o contato entre gatos e com pulgas nas infecções por retrovírus, e outras formas de transmissão para *Ehrlichia spp.* além de picadas por carrapatos. Considerando que todos os agentes infecciosos pesquisados são potenciais patógenos causadores de anemia, e que a associação deles pode aumentar a severidade da doença, a identificação destes e suas associações, assim como dos fatores de risco relacionados, devem ser realizados por todos os clínicos veterinários para estabelecer monitoramento e prognóstico adequados dos pacientes.


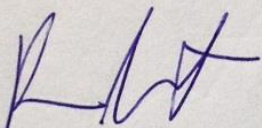
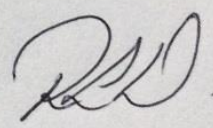
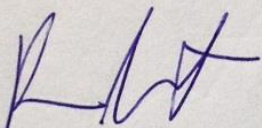
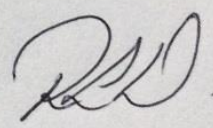
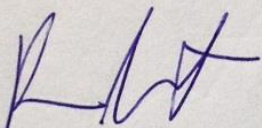
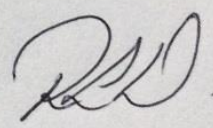
5. APÊNDICES

5.1 FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA E QUESTIONÁRIO

FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA E QUESTIONÁRIO PARA AVALIAÇÃO DOS FATORES DE RISCO PARA INFECÇÕES E COINFECÇÕES POR HEMOPARASITAS E RETROVÍRUS EM GATOS DOMÉSTICOS	
NOME DO ANIMAL: _____ RAÇA: _____ SEXO: _____ IDADE: _____	
PROPRIETÁRIO: _____ E-MAIL: _____ DATA: ____/____/____	
EXAME CLÍNICO	
MUCOSAS: _____	
HIDRATAÇÃO: _____	
TEMPERATURA: _____	
AUSCULTA CARDÍACA E PULMONAR: _____	
PALPAÇÃO ABDOMINAL: _____	
LINFONODOS: _____	
COMPORTAMENTO: _____	
OUVIDOS: _____	
CAVIDADE ORAL: _____	
PELE: _____	
OUTRAS ALTERAÇÕES: _____	
HISTÓRICO	
1- JA TEVE PULGAS ALGUMA VEZ?	10- FOI DIAGNÓSTICADO COM ALGUMA DOENÇA NO PASSADO OU RECENTEMENTE?
SIM () NÃO ()	SIM ()* NÃO ()
2- JA TEVE CARRAPATOS ALGUMA VEZ?	*QUAL: _____
SIM () NÃO ()	_____
4- JA FOI MORDIDO POR ALGUM GATO?	_____
SIM () NÃO ()	
5- JA TEVE CONTATO COM OUTROS GATOS?	
SIM () NÃO ()	
8- JÁ TEVE ACESSO A RUA?	
SIM () NÃO ()	

6. ANEXOS

6.1 CERTIFICADO DE APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA SCA

	Universidade Federal do Paraná Setor de Ciências Agrárias Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA SCA		
<p style="text-align: center;">CERTIFICADO</p> <p>Certificamos que o protocolo no. 047/2012, referente ao projeto “Ocorrências de coinfeções em gatos domésticos anêmicos e não anêmicos”, sob a responsabilidade de Patricia Yukiko Montano, na forma em que foi apresentado (uso de 150 gatos), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 06 de fevereiro de 2013.</p> <p style="text-align: center;">CERTIFICATE</p> <p>We certify that the protocol number 047/2012, regarding the project “Ocorrências de coinfeções em gatos domésticos anêmicos e não anêmicos”, under the charge of Patricia Yukiko Montano, in the terms it was presented (use of 150 cats), was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Paraná, Southern Brazil) during session on February 06, 2013.</p> <p style="text-align: right;">Curitiba, 06 de fevereiro de 2013.</p> <table><tr><td> Patrick Schmidt Presidente</td><td> Rosangela Locatelli Dittrich Vice-Presidente</td></tr></table> <p style="text-align: center;">Comissão de Ética no Uso de Animais Setor de Ciências Agrárias Universidade Federal do Paraná.</p>		 Patrick Schmidt Presidente	 Rosangela Locatelli Dittrich Vice-Presidente
 Patrick Schmidt Presidente	 Rosangela Locatelli Dittrich Vice-Presidente		

OCORRÊNCIA DE COINFECÇÕES EM GATOS DOMÉSTICOS ANÊMICOS E NÃO ANÊMICOS

Coinfection occurrence in Anemic and Nonanemic Cats

Patrícia Yukiko MONTAÑO¹; Aline Baumann da Rocha GIZZI¹; Christian LEUTENEGER²; Alexander Welker BIONDO¹; Rosângela Locatelli DITTRICH¹.

1 Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil. E-mail: roslocdi@ufpr.br

2 Idexx Laboratories, Sacramento, Califórnia, Estados Unidos.

Resumo

O diagnóstico das anemias causadas por hemoparasitas é um desafio devido à baixa sensibilidade e especificidade da técnica do esfregaço sanguíneo. As coinfeções são ainda subdiagnosticadas, apesar de serem importantes para determinar a severidade da doença. O presente estudo determinou a prevalência dos principais agentes responsáveis por anemia em gatos e avaliou a presença de coinfeções. Foram analisadas amostras de sangue de gatos anêmicos e não anêmicos por PCR em tempo real para pesquisa de *Anaplasma spp.*, *Bartonella spp.*, *Cytauxozoon felis*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum* e *Candidatus Mycoplasma turicensis*, e dos vírus da Leucemia felina (FeLV) e Imunodeficiência felina (FIV). Do total das amostras, 23/72 (31,94%) foram positivas, sendo que 10/72 (13,88%) apresentaram coinfeções. Dos gatos anêmicos, 5/14 (35,71%) apresentaram coinfeção, assim como 3/29 (10,34%) dos gatos doentes não anêmicos e 2/29 (6,89%) dos gatos saudáveis. Os agentes mais prevalentes neste estudo foram FeLV com 18,05% ($p < 0,0001$), *Candidatus Mycoplasma haemominutum* com 13,88% ($p=0,0292$) e *Candidatus Mycoplasma turicensis* com 6,94% ($p=0,0349$). Estes dados revelam uma alta prevalência de hemoparasitas e coinfeções em gatos anêmicos e, ainda, a existência de portadores assintomáticos coinfectados.

Palavras-chave: hemoparasitas, coinfeções, gatos, PCR em tempo real

Abstract

Diagnosis of hemoparasite related anemia is a challenge due to low sensitivity and specificity of the blood smear technique. Coinfections are still sub diagnosed, although they have an important effect on the severity of an illness. This study determined the prevalence of the main responsible agents for cat anemia and evaluated the presence of coinfections. Blood samples of anemic and nonanemic cats were evaluated using real time PCR for *Anaplasma spp.*, *Bartonella spp.*, *Cytauxozoon felis*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum* and *Candidatus Mycoplasma turicensis*, and Feline Leukemia (FeLV) and Feline Immunodeficiency (FIV) viruses. Of the total samples, 23/72 (31,94%) were positive, being 10/72 (13,88%) presented coinfections. Amongst anemic cats, 5/14 (35,71%) presented coinfections, as well as 3/29 (10,34%) of the sick nonanemic cats and 2/29 (6,89%) of the healthy cats. The most prevalent agents in this study were Feline Leukemia virus at 18,05% ($p <$

0,0001), *Candidatus Mycoplasma haemominutum* at 13,88% ($p=0,0292$) and *Candidatus Mycoplasma turicensis* at 6,94% ($p=0,0349$). The data reveals a high prevalence of hemoparasites and coinfections in anemic cats and, besides, an existence of asymptomatic carriers coinfecting.

Keywords: hemoparasites, coinfections, cats, Real Time PCR

Introdução

O diagnóstico das anemias causadas por hemoparasitas em gatos é um desafio devido à baixa sensibilidade e especificidade da técnica do esfregaço sanguíneo. As coinfeções muitas vezes são desconhecidas, mas de extrema importância porque aumentam a severidade da doença e exigem abordagem clínica e prognóstico diferenciados (Macieira, 2008). Entre os principais agentes infecciosos causadores de anemia em gatos estão o *Mycoplasma haemofelis*, o vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e o vírus da Leucemia Felina (FeLV). Porém, outros agentes menos relatados, como o *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, *Candidatus Mycoplasma turicensis*, *Cytauxzoon felis*, *Anaplasma sp.*, *Bartonella sp.* e *Ehrlichia sp.* também são causadores. A técnica de PCR em tempo real (RT-PCR) é uma perspectiva inovadora para o diagnóstico, permitindo detectar e quantificar esses agentes. O presente estudo objetivou determinar a prevalência dos agentes acima mencionados, por RT-PCR, e avaliar a presença de coinfeções.

Material e Métodos

No estudo foram avaliadas 72 amostras de sangue de gatos, sendo 14 anêmicos, 29 doentes não anêmicos e 29 saudáveis. As amostras foram coletadas por venopunção da jugular e da ponta de orelha (confeção dos esfregaços). Os gatos foram atendidos na rotina clínica particular em Curitiba/PR. Os gatos com sinais clínicos de anemia e hematócrito $\leq 24\%$ foram classificados como anêmicos; gatos com alguma alteração em exame clínico e/ou laboratorial e hematócrito $> 24\%$ foram classificados como doentes e os demais como saudáveis. As amostras foram enviadas sob refrigeração para o Laboratório Idexx, nos Estados Unidos, para análise pela técnica do PCR em tempo real para os seguintes agentes: *Anaplasma spp.*, *Bartonella spp.*, *Cytauxzoon felis*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma haemofelis*, *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, *Candidatus Mycoplasma turicensis*, vírus da imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia felina (FeLV); e pelo método de ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay) para detecção de anticorpos contra FIV e antígenos da FeLV.

Resultados e Discussão

Dos 72 gatos, 23/72 (31,94%) foram positivos para pelo menos um agente etiológico, sendo que 10/72 (13,88%) apresentaram coinfeções. No grupo dos gatos anêmicos, 11/14 (78,57%) foram positivos, sendo que destes, 6/14 (42,85%) apresentaram infecção única pelo vírus da Leucemia felina (FeLV). Ainda, 5/14 (35,71%) dos anêmicos apresentaram coinfeção, sendo 3/14 (21,42%) com

Candidatus Mycoplasma haemominutum e FeLV. No grupo dos gatos doentes não anêmicos 6/29 (20,68%) foram positivas e o grupo dos saudáveis apresentou esta mesma porcentagem. Dos gatos doentes não anêmicos, 3/29 (10,34%) apresentaram coinfeção, e dos gatos saudáveis 2/29 (6,89%). Não houve diferença significativa entre o grupo dos gatos saudáveis e doentes não anêmicos. Coinfecções com FeLV são achados comuns em gatos com hemoparasitas segundo Macieira (2008). O mesmo autor diz ainda que os gatos podem ser portadores assintomáticos, e neste estudo destaca-se a presença de coinfeção de um gato saudável com FIV e FeLV, e outro com *Mycoplasma haemofelis* e *Candidatus Mycoplasma haemominutum*.

Do total de amostras, houve positividade de 1/72 (1,38%) para *Bartonella spp.*, 2/72 (2,77%) para *Ehrlichia spp.*, 3/72 (4,16%) para *Mycoplasma haemofelis*, e 6/72 (8,33%) para FIV. Não houve positividade em nenhum dos grupos para *Cytauxzoon felis* e *Anaplasma spp.* Todas as amostras foram negativas na análise do esfregaço de ponta de orelha. Os agentes mais prevalentes neste estudo foram FeLV com 18,05% ($p < 0,0001$), *Candidatus Mycoplasma haemominutum* com 13,88% ($p=0,0292$) e *Candidatus Mycoplasma turicensis* com 6,94% ($p=0,0349$), diferente de um estudo realizado por Baumann et al. (2006) que verificaram maior prevalência do *Mycoplasma haemofelis* do que *Candidatus Mycoplasma haemominutum* em gatos anêmicos no sul do Brasil.

Conclusão

O vírus da Leucemia Felina é um dos grandes causadores de anemia em gatos e coinfecções com hemoparasitas, principalmente com *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, são possíveis agravantes da doença. Gatos saudáveis podem ser portadores assintomáticos de mais de um agente, evidenciando que por mais patogênicos sejam esses agentes, a reação imunológica do hospedeiro desempenha papel importante na determinação do estado de portador.

Referências

Baumann, A., Guimaraes, A.M.S, Silva, C.C., Yamaguti, M., Kozemjakim, D.A., Messik, J.B., Biondo, A.W., Timenetsky, J. *Mycoplasma haemofelis* and *Candidatus Mycoplasma haemominutum* detection by PCR in anemic domestic cats (*Felis catus*) from Curitiba, Brazil: a preliminary study. In: American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) 41st. Annual Meeting. Anais, Tucson, 2006.

Macieira, D.B. Hemoplasmas em gatos domésticos: prevalência e sua associação à infecção natural pelos vírus da Imunodeficiência e/ou Leucemia felinas. 2008. 108f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ.